

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TESIS DOCTORAL

CONTROL BIOLÓGICO E INTEGRADO DE LA GARRAPATA
"*HYALOMMA LUSITANICUM*" EN EXPLOTACIONES SILVO-AGRO-
CINEGÉTICAS DE ECOSISTEMA MESOMEDITERRÁNEO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Silvia del Carmen Cota Guajardo

Directores

Ángeles Sonia Olmeda García
Félix Valcárcel Sancho
José Luis Pérez Sánchez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



CONTROL BIOLÓGICO E INTEGRADO DE LA GARRAPATA *Hyalomma lusitanicum* EN EXPLOTACIONES SILVO-AGRO-CINEGÉTICAS DE ECOSISTEMA MESOMEDITERRÁNEO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

Silvia del Carmen Cota Guajardo

Bajo la dirección de los doctores

Ángeles Sonia Olmeda García

Félix Valcárcel Sancho

José Luis Pérez Sánchez

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

CONTROL BIOLÓGICO E INTEGRADO DE LA GARRAPATA *Hyalomma lusitanicum* EN EXPLOTACIONES SILVO-AGRO-CINEGÉTICAS DE ECOSISTEMA MESO-MEDITARREÁNEO

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR

Silvia del Carmen Cota Guajardo

DIRIGIDA POR:

Á. Sonia Olmeda García

Félix Valcárcel Sancho

José Luis Pérez Sánchez

***Este trabajo está dedicado a
mis padres, mis raíces y mis alas.
A mis hermanos, por compartir conmigo esta jornada,
a mis sobrinos, mi fe en un futuro mejor.
To Mike: the wind beneath my wings.***

AGRADECIMIENTOS:

Un doctorado no es solo un grado académico más en el currículo. Implica un crecimiento personal, intelectual, moral y espiritual. La obtención de un doctorado requiere de trabajo arduo, mucho tesón y mucho apoyo de otros. Afortunadamente todos los que nos aventuramos a esta jornada, siempre contamos con aliados y amigos que nos ayudan a seguir adelante. A todos y cada uno de ellos, deseo expresarles mi más profunda gratitud. Esta ha sido una jornada particularmente larga, divida en dos universos diferentes y no quisiera olvidar mencionar a alguien, por lo que ruego a todos los implicados, que aun cuando no mencione sus nombres, sepan que los tengo en mi corazón.

Quiero mencionar especialmente a mi tutora, la Dra. Ángeles Sonia Olmeda García, y a mis co-tutores los Doctores Félix Valcárcel y José Luis Pérez, quienes han dado su toque personal a este trabajo y sobre todo mucho apoyo siempre.

A mis profesores del doctorado y a todos los profesores del Departamento de Sanidad Animal. También a Agustín y Reyes.

A José María Tercero y todo el personal de la Finca “La Garganta” por su apoyo en el trabajo de campo y especialmente por su amabilidad y hospitalidad.

A todos ellos les agradezco haber hecho de mi estancia en España una experiencia memorable y rica.

Pero también en México hubo muchas personas siempre respaldándome y animándome en todo momento, ellas son la Dras. María Teresa Quintero y Soila Maribel Gaxiola (mi “mestra” hoy siempre) por haber impulsado mis sueños.

Por supuesto, en esta empresa mi familia ha sido mi pilar de sostén por eso quiero agradecer a mi padre Eduardo Cota y mi madre Silvia Guajardo por haberme enseñado a seguir mi propio camino, por haberme enseñado a

pensar y sobre todo por apoyarme siempre en todos mis proyectos, especialmente en este que ha sido difícil para todos nosotros, por todos los sacrificios que tuvimos que hacer y por la incertidumbre que genera hacer cambios de esta magnitud.

A mi hermana, de quien admiro su fuerza de voluntad y su carácter. Porque su ejemplo me ha demostrado que no hay obstáculos, excepto los que nosotros creamos en nuestra propia mente.

A mi hermano, de quien constantemente aprendo cosas nuevas. Por enseñarme a tener la mente abierta a nuevas ideas y conocimientos.

To Mike for being the source of my strength, for being there all this time, but above all, for sharing my dreams and helping me to make them come true.

También a Marcela Álvarez Ramos, por llenar mi vida con su alegría, por compartir su sueños, vivencias, pero sobre todo por su apoyo en los momentos difíciles. Una de las cosas más valiosas que encontré en esta jornada fue su amistad.

A CONACYT por ayudarnos a aquellos que nos atrevimos a soñar con ser mejores, a consolidar ese sueño para aportar nuestro granito de arena y hacer de México el gran país que puede llegar a ser.

Al Dr. Jesús José Portillo Loera, quien me asesoró en la parte estadística de la tesis y cuya ayuda fue fundamental para concluir este proyecto.

Finalmente, quiero agradecer a Su Gracia el Duque de Westminster las facilidades y apoyo recibido para la realización de este trabajo.

Índice

Índice

1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica.....	7
2.1. Las garrapatas. Generalidades	9
2.2 .Clasificación taxonómica	9
2.3. Evolución de las garrapatas	11
2.4. Morfología externa de los adultos ixódidos.....	13
2.4.1. Capítulo	14
2.4.2. Idiosoma	16
2.5. Biología de las garrapatas	18
2.6. Garrapatas en la Península Ibérica	28
2.6.1. Género <i>Hyalomma</i>	32
2.6.2. <i>Hyalomma lusitanicum</i>	33
2.7. Importancia de las garrapatas	35
2.8. Métodos de control de garrapatas	38
2.8.1. Control en el medio.....	39
2.8.1.1. Prácticas tradicionales.....	40
2.8.1.2. Reducción de hospedadores	41
2.8.1.3. Aplicación de productos químicos	42
2.8.2. Lucha biológica.....	44
2.8.2.1. Depredadores.....	45
2.8.2.2. Parasitoides	48
2.8.2.3. Patógenos	49
2.8.2.3.1. Nematodos	50
2.8.2.3.2. Bacterias.....	51
2.8.2.3.3. Protozoos	52
2.8.2.3.4. Hongos entomopatógenos.....	53
2.8.2.3.5. Virus	57
2.8.3. Control sobre animales	57
2.8.3.1. Vacunas.....	58
2.8.3.2. Selección genética.....	63
2.8.3.3. Acaricidas	63
2.9. Biopesticidas	69
2.9.1. Biopesticidas microbianos	70
2.9.2. Biopesticidas bioquímicos	71
2.9.3. Productos Derivados de Plantas (PDP).....	78
2.10. Control Integrado.....	82

3. Justificación y objetivos	87
4. Material y Métodos	91
4.1. Estación de estudio de los ensayos de campo	93
4.2. Ixodifauna y dinámica estacional	93
4.2.1. Muestreos de garrapatas en vegetación	93
4.2.2. Muestreos de garrapatas en hospedadores	97
4.3. Ciclo de <i>H. lusitanicum</i> en condiciones de laboratorio	98
4.4. Productos	102
4.5. Ensayos	102
4.5.1. Eficacia ixodicida del ácido oxálico en condiciones de campo	102
ENSAYO de aplicación del AO con manguera	104
ENSAYO de aplicación del AO con UBV	105
4.5.2. Ensayos <i>in vivo</i>	108
4.5.2.1. Ensayos en conejos experimentalmente infestados en condiciones controladas de laboratorio	108
ENSAYO 1: Eficacia ixodicida del espinosad administrado por vía oral en infecciones experimentales	109
ENSAYO 2: Determinación de la dosis de espinosad ingerida libremente en pienso	111
ENSAYO 3: Eficacia ixodicida del espinosad ingerido libremente en infecciones experimentales	111
4.5.2.2. Ensayos en condiciones semicontroladas en conejos de campo naturalmente infestados.	113
ENSAYO 4: Eficacia ixodicida del espinosad administrado por vía oral en infecciones naturales	113
ENSAYO 5: Determinación de la dosis de espinosad ingerida libremente en distintos alimentos.	114
ENSAYO 6: Determinación de la dosis de espinosad ingerida libremente en presencia de alimento no medicado	115
4.5.2.3. Ensayo <i>in vivo</i> con espinosad en condiciones de campo	117
ENSAYO 7: Determinación de la eficacia ixodicida de la dosis de espinosad ingerida libremente por conejos silvestres en completa libertad	117
4.5.2.4 Toxicidad del espinosad	118
4.6. Análisis estadísticos	118
5. Resultados y discusión	121
5.1. Garrapatas en la vegetación	123
5.2. Garrapatas en hospedadores	128

5.2.1. Índice de parasitación del ciervo	131
5.2.2. Índice de parasitación del conejo	133
5.2.3. Índice de parasitación del jabalí	136
5.3. Fenología de las garrapatas encontradas	139
5.3.1. Fenología de <i>Dermacentor marginatus</i>	140
5.3.2. Fenología de <i>Rhipicephalus bursa</i>	141
5.3.3. Fenología de <i>Rhipicephalus pusillus</i>	143
5.3.4. Fenología de <i>Ixodes ricinus</i>	144
5.3.5. Fenología de <i>Ixodes ventraloi</i>	145
5.3.6. Fenología de <i>Hyalomma lusitanicum</i>	145
5.3.6.1. <i>H. lusitanicum</i> en la vegetación	145
5.3.6.2. <i>H. lusitanicum</i> en los hospedadores	146
5.3.6.3. Fenología global de <i>H. lusitanicum</i>	147
5.3.6.4. Ciclo biológico de <i>H. lusitanicum</i> en condiciones de laboratorio	150
5.4. Tratamientos en suelo con ácido oxálico	153
ENSAYO de aplicación del AO con manguera.....	154
ENSAYO de aplicación del AO con UBV	155
5.5. Ensayos en conejos experimentalmente infestados en condiciones controladas de laboratorio	157
ENSAYO 1: Eficacia ixodocida del espinosad administrado por vía oral en infecciones experimentales	157
ENSAYO 2: Determinación de la dosis de espinosad ingerida libremente en pienso	159
ENSAYO 3: Eficacia ixodocida del espinosad ingerido libremente en infecciones experimentales.....	160
5.6. Ensayos en condiciones semicontroladas en conejos de campo naturalmente infestados	164
ENSAYO 4: Eficacia ixodocida del espinosad administrado por vía oral forzada en infestaciones naturales	164
ENSAYO 5: Determinación de la dosis de espinosad ingerida libremente por conejos silvestres en distintos alimentos.....	165
ENSAYO 6: Determinación de la dosis de espinosad ingerida libremente en presencia de alimento no medicado.....	167
5.7. Ensayo con espinosad in vivo en condiciones de campo	168
ENSAYO 7: Determinación de la eficacia ixodocida de la dosis de espinosad ingerida libremente por conejos silvestres en completa libertad.	168
5.8. Toxicidad del espinosad en conejos silvestres	169
6. Conclusiones	177
7. Resumen/Abstract	183
8. Bibliografía.....	187

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son artrópodos parásitos, hematófagos obligados, que pertenecen a la Clase Arachnida, Superorden Parasitiformes, Orden Ixódida (NCBI Taxonomy browser, 2012). Los ixódidos engloban a 3 familias de las cuales dos, Ixodidae (garrapatas duras) y Argasidae (garrapatas blandas) se encuentran en España (Márquez-Jiménez y col., 2005). La Familia Ixodidae cuenta con 12 Géneros y 683 Especies (Horak y col., 2002). En la Península Ibérica se han identificado hasta 20 especies, 9 del Género *Ixodes*; 4 de *Haemaphysalis*; 2 de *Dermacentor*; 5 de *Rhipicephalus* y 4 de *Hyalomma* (Cordero del Campillo y col., 1994; de la Fuente y col., 2004; Merino y col., 2005).

Los cambios socioeconómicos y climáticos han producido un incremento en todo el mundo de la incidencia en humanos de enfermedades transmitidas por garrapatas, hasta ser consideradas como patologías emergentes y reemergentes. Como reflejo de la misma tendencia, en España, durante los últimos 30 años también se han presentado brotes de enfermedades transmitidas por garrapatas en humanos (de la Fuente y col., 2004). Entre los patógenos transmitidos en la Península Ibérica se han identificado en garrapatas: *Rickettsia slovaca*; *Rickettsia massiliae*; *Rickettsia conorii* (entre otras rickettsias); *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*; *Coxiella burnetii*; *A. marginale*; *A. phagocytophilum* y *Ehrlichia* spp. (de la Fuente y col., 2004; Merino y col., 2005) todas estas se han localizado en las diferentes especies de garrapatas identificadas en dicha área geográfica.

Así mismo, en el área ganadera la infestación por garrapatas es un grave problema económico y sanitario (Jongejan y Uilenberg, 2004), lo que justifica los elevados gastos derivados de su control, estimados entre 13,9 y 18,7 mil-millones de dólares anuales a nivel mundial (Gosh y col., 2007).

En el control de garrapatas se han utilizado principalmente compuestos químicos, con el coste económico y medioambiental que ello conlleva, además de la generación, a largo plazo, de resistencias. Por estas razones la tendencia actual es el desarrollo de métodos de control alternativos e

integrados. Una de las alternativas son los biopesticidas, sustancias derivadas de fuentes naturales como animales, plantas, bacterias y ciertos minerales. A finales del año 2008 existían aproximadamente 195 sustancias activas biopesticidas registradas y 780 productos comerciales (EPA, 2010).

Entre los biopesticidas existen numerosos extractos de plantas, entre ellos destaca el aceite de neem obtenido del árbol de Neem (*Azadirachta indica*), su principal agente activo es la Azadiractina, el cual posee actividad insecticida/acaricida ya que funciona interviniendo en la alimentación de los artrópodos y en los procesos hormonales del desarrollo de los mismos (Schmutterer, 1990) cuando se aplica sobre el hospedador (bovino, ovino o caprino) por vía tópica o sistémica, (Kaaya y col., 2007; Makeri y col., 2007; George y col., 2008b).

Otros biopesticidas son los ácidos orgánicos, como el oxálico, un metabolito del etilenglicol, ubicuo en el medio ambiente, encontrándose tanto en el humo del tabaco o vehículos, como en el suelo o la atmósfera (TOXNET, 2007). También forma parte, como sal de potasio o de calcio, de plantas y mamíferos (orina y huesos). Es uno de los tratamientos orgánicos más comunes en el control de la varroosis de las abejas (Gregor y Planic, 2004; Aliano y col., 2009; Pérez, 2006). Siendo también eficaz como ixodicida (Kirkland y col., 2005; Olmeda y col., 2008).

Otro de los métodos alternativos es el Control Biológico, entendido como *“La acción ejercida por parásitos, depredadores o patógenos, para mantener la densidad de población de otros organismos en niveles más bajos de los que existirían sin la acción de estos enemigos naturales”* (CTCB, 2009).

Dentro del uso de patógenos se mencionan principalmente el uso de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, estos parecen tener efectividad en condiciones de laboratorio en *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* con mortalidades que van desde 10 hasta 97%, según especie y estadio de desarrollo (Kaaya y Hassan, 2000; Maranga y col., 2005; Bahiense y col., 2006).

Entre los parasitoides, asociación intermedia entre el parasitismo y la depredación, destacan los himenópteros de la especie *Ixodiphagus hookeri*, una avispa de pequeño tamaño que deposita sus huevos en la cavidad corporal de estadios inmaduros y alimentados de garrapatas. Tras la eclosión, las larvas de la avispa se alimentan de los tejidos de las garrapatas hasta provocarles la muerte (Mwangi y col., 1997), emergiendo las avispas como adultos. Se han llevado a cabo ensayos de laboratorio y en campo en distintas especies de garrapatas con diferentes resultados (Hu y col., 1998 y Coronado, 2008).

Otra de las apuestas a futuro para el control de la parasitación por garrapatas son las vacunas recombinantes (Almazán, 2010; de la Fuente y col., 2007). La complejidad del ciclo de los ixódidos, alternando fases parásitas y otras de vida libre, y distintas especies de hospedadores, así como su gran capacidad para superar condiciones adversas, hacen que el control de su población sea muy difícil. El éxito de la empresa depende de una acción integrada de distintos métodos y en momentos estratégicos del ciclo. Para ello es imprescindible conocer las especies de garrapatas y la dinámica estacional en la zona de trabajo.

Hyalomma lusitanicum es la garrapata exófila más abundante de la zona centro de la Península Ibérica (Basco y col., 2008). Los estadios adultos se alimentan sobre ganado y otros rumiantes silvestres, en tanto que los estadios, inmaduros suelen hacerlo en conejos. En su ciclo se alimenta en tres hospedadores y su máxima actividad se detecta de Mayo a Septiembre (Estrada-Peña, 2004a; Basco y col., 2008). Es vector de *Theileria annulata*, siendo la theileriosis mediterránea, endémica de esta zona. Además, aunque es poco antropofílica, podría tener cierta importancia en salud pública ya que se han detectado mediante técnicas de biología molecular en esta especie agentes zoonóticos (*Coxiella burnetii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia spp*, *Francisella tularensis* y *Rickettsia spp*) (Estrada-Peña, 2004b, Toledo y col., 2009). El control de la población de garrapatas en la zona centro peninsular requiere la elaboración de un plan integrado y estratégico diseñado para *Hyalomma lusitanicum*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1. LAS GARRAPATAS: GENERALIDADES

Las garrapatas son ectoparásitos obligados y temporales de mamíferos, aves y reptiles. Su alimentación es exclusivamente hematófaga en todos sus estadios. En general, se alimentan una sola vez en cada fase de desarrollo y durante períodos que pueden variar desde minutos a varios días o, incluso, semanas. El tiempo que tardan en completar su ciclo biológico es también muy variable, llegando en algunas ocasiones a requerir hasta 7 años (Komplen y Black., 1996; Barker y Murell, 2008; Bowman y Nutall, 2008; Bermúdez y col., 2010).

Su distribución geográfica comprende desde la región sub-ártica, pasando por la ecuatorial hasta la región antártica, en hábitats que van desde el desierto hasta el bosque tropical (Barker y Murell, 2008; Bowman y Nutall, 2008; Bermúdez y col., 2010).

Aproximadamente el 80% de la población mundial de garrapatas son ixódidos, también denominadas garrapatas duras, por poseer un escudo dorsal quitinizado. Además de ser las más abundantes, son las de mayor importancia médica y veterinaria. Los géneros más importantes de garrapatas duras son: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* y *Rhipicephalus* (Incluye *Boophilus*). El 20% restante lo comprenden los argásidos o garrapatas blandas, denominadas así porque su cutícula externa es flexible. La fauna mundial de argásidos se divide en cuatro géneros: *Argas*, *Carios*, *Ornithodoros* y *Otobious* (Jongejan y Uilenberg, 2004).

2. 2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Las garrapatas se encuentran dentro del Phylum Arthropoda, Clase Arachnida, Superorden Parasitiformes (Metastigmata), Orden Ixódida (Figura 1) cuya característica principal es la posición de los estigmas respiratorios, en localización latero-ventral, posteriores al cuarto par de patas (Barker y Murell, 2008; Bowman y Nutall, 2008; Bermúdez y col.,

2010). Así mismo están incluidas en la Subclase Acari, y se distinguen de otros individuos de este mismo taxón por dos características principales: su gran tamaño, que va de 2-30 mm y que en las hembras saciadas puede llegar hasta 2 cm, y su aparato bucal, perfectamente adaptado a su tipo de alimentación, el cual posee una serie de dentículos, que permite una eficiente fijación en la piel de los animales de cuya sangre se alimenta. Otra característica distintiva es una estructura sensorial especializada, que se localiza en los tarsos, denominada órgano de Haller (Komplen y Black, 1996; Gállego, 2006).

Se considera que el orden Ixodida, está dividido en tres familias: Ixodidae con 720 especies, Argasidae con 186 especies, ambas ampliamente distribuidas a nivel mundial y Nuttalliellidae con una sola especie presente únicamente en África (Komplen y Black, 1996; Bowman y Nutall, 2008; Barker y Murell, 2008; Bermúdez y col., 2010).

A pesar de los esfuerzos, la familia Nuttalliellidae aún está sin resolver. Esto se debe a que *Nuttalliella namaqua*, la única especie de esta familia, no ha sido capturada en muchos años y todos los intentos de amplificar su ADN a partir de especímenes de museos ha resultado solo en la amplificación de ADN de hongos que infectaron a las garrapatas ya sea antes o después de su muerte (Bowman y Nutall, 2008). Así pues las familias de interés son dos, Argasidae e Ixodidae.

La monofilia de las familias no se había cuestionado hasta ahora, pero recientes estudios basados en la secuenciación de ADN ribosomal del gen 16S y 18S, sugieren algunos cambios (Komplen y Black, 1996). Así pues en los años recientes ha habido grandes avances en el entendimiento de la filogenia y evolución de las garrapatas, en particular de las garrapatas duras (Ixodida). Actualmente el consenso acerca de la filogenia de las garrapatas duras es bastante diferente de la hipótesis de trabajo de hace 10 años. Esto ha provocado algunas modificaciones, como la absorción de algunos taxones, por ejemplo la subfamilia *Hyalomma* ahora dentro de *Rhipicephalinae*, o la creación de otras subfamilias como *Bothriocrotoninae*, para albergar un linaje de divergencia temprana de garrapatas de Australia,

que solían clasificarse en el género *Aponomma*, en tanto que las especies restantes de este género, continúan incluyéndose en el género *Amblyomma*. Otra modificación importante fue el reconocimiento de que el género *Rhipicephalus* es parafilético al género *Boophilus*, por lo que este último se ha convertido en un subgénero de *Rhipicephalus*, ejemplo: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Bowman y Nutall, 2008).

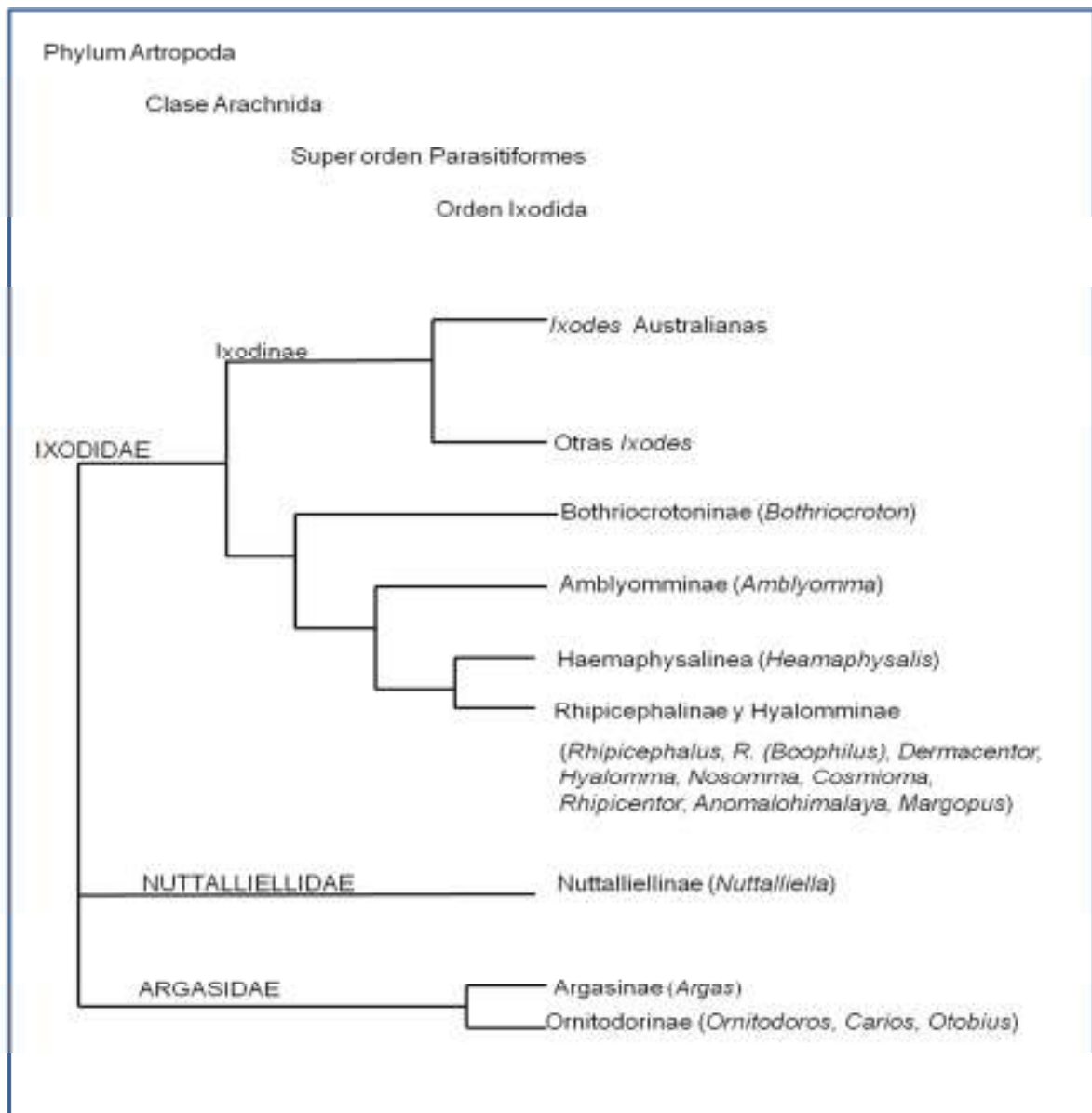


Figura 1. Taxonomía de las garrapatas

2.3. EVOLUCIÓN DE LAS GARRAPATAS

Las garrapatas son artrópodos, cuyo nombre significa “partas articuladas” (del griego *arthron*= articular y *podos* = pie). Estos aparecieron en los mares

del Cámbrico hace más de 500 millones de años, en el Paleozoico tardío o en el Mesozoico temprano y desde entonces han sido el grupo dominante sobre la tierra. Fueron también los primeros animales que pasaron del ambiente acuático al terrestre donde bajo las condiciones ambientales adecuadas algunos de los artrópodos evolucionaron hacia el parasitismo (Hoffman, 1988; Komplen y Black, 1996; Rodríguez Diego y col., 2009).

El estudio de la evolución de las garrapatas ha sido complicado debido a la falta de fósiles. La mayoría de los estudios sobre la evolución de las garrapatas llevados a cabo desde 1950 se han basado en el trabajo de Harry Hoogstral, para quien son claramente específicas de un hospedador, lo cual constituye a primera vista la evidencia de co-especiación (Komplen y Black, 1996).

Cuando los reptiles del Paleozoico se diversificaron y conquistaron una gran variedad de hábitats terrestres y acuáticos, los ancestros de las garrapatas que hoy conocemos, evolucionaron en dos líneas diferentes: Ixodidae y Argasidae (Komplen y Black, 1996; Rodríguez Diego y col., 2009), y quizá también en la controvertida Nutalliellidae.

Pese a la falta de fósiles se sabe que, como en la actualidad, presentaban tres estadios del desarrollo: larva, ninfa y adulto. El grado de co-evolución dependió de la familia, por ejemplo, la mayoría de los Argásidos siguen habitando cerca de sus hospedadores, condicionando su tamaño al de este y como mecanismo de defensa acortaron los tiempos de alimentación. La teoría de la co-evolución de las garrapatas asociada a los hospedadores ha sido revisada y actualmente se considera que la evolución de los Argásidos podría estar determinada por su adaptación a un tipo de hábitat más que a su adaptación a un hospedador en particular (Komplen y Black, 1996).

En cuanto a los Ixódidos, estos se han adaptado biológica y ecológicamente, reduciendo su tamaño respecto a sus ancestros prehistóricos y ovipositan una gran cantidad de huevos para lograr la perpetuación de la especie (Rodríguez Diego y col., 2009).

2.4. MORFOLOGIA EXTERNA DE LOS ADULTOS IXÓDIDOS

Estas garrapatas poseen características externas bien diferenciadas que las hacen fácilmente distinguibles de otros ácaros. La principal característica diferencial de las garrapatas con otros ácaros y que a la vez diferencia a los Argásidos de los Ixódidos, lo constituye la presencia de un engrosamiento de la cutícula dorsal: **el escudo**. El cuerpo tiene forma de gota y se encuentra dividido en capítulo o gnatostoma y el idiosoma, en donde se observa la presencia del escudo esclerificado, que en el caso de los machos cubre totalmente su superficie y en las hembras solo cubre su parte anterior, como se observa en la figura 2 (Bowman, 1999; Gállego, 2006).

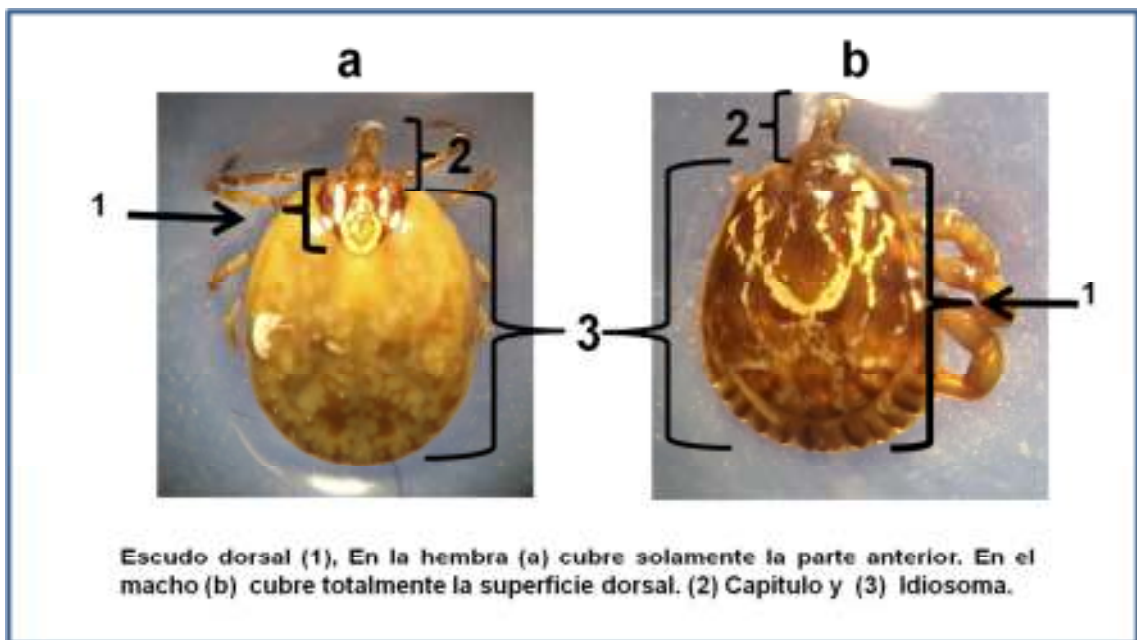


Figura 2. Vista dorsal del macho y hembra ixódidos

Como en todos los ácaros, las garrapatas poseen una cobertura externa a la cual se le denomina tegumento. Está constituida por la epidermis y la cutícula, que es la parte externa que actúa como protección primaria frente a la pérdida de agua. El tegumento actúa también como exoesqueleto, proporcionando protección, además de ser el punto de inserción de los músculos (Bowman, 1999; Gállego, 2006).

También forman parte de la cutícula otras estructuras como son: pelos sensoriales, cerdas, glándulas dérmicas y sensilas. Los pelos sensoriales y cerdas están distribuidos por el cuerpo, capítulo y patas, siendo abundantes en los adultos y ninfas, pero escasas en las larvas. Estas estructuras tienen una función mecano sensorial y en ocasiones termo sensorial. Las glándulas dérmicas se hallan dispersas por todo el cuerpo, secretando una sustancia oleosa que se solidifica al entrar en contacto con el medio ambiente, la cual actúa como secreción impermeabilizante para evitar la desecación (Sonenshine, 1991).

Una característica diferencial importante de las garrapatas duras es el aparato bucal, y su posición con respecto al cuerpo. A continuación se exponen las principales características morfológicas de los Ixódidos.

2.4.1. CAPÍTULO

El capítulo está formado por el gnatostoma o aparato bucal (Figura 3), incluyendo a los quelíceros, estructuras que en los Ixódidos sirven para cortar y rasgar la piel, los palpos (con función protectora) y el hipostoma, que le permiten fijarse al hospedador. El aparato bucal está inserto en una pieza llamada base del capítulo, la cual está articulada con el idiosoma. Esta articulación posee gran movilidad, lo que le permite formar un ángulo recto respecto a su zona ventral. La forma de la base del capítulo varía con las especies, pudiendo ser rectangular, hexagonal o semi triangular. En sus ángulos laterales del borde posterior de esta pieza, pueden apreciarse unas apófisis denominadas córnulas. En las hembras en la zona dorsal de la base del capítulo existen dos depresiones o fosetas pequeñas de contorno redondeado, con numerosas sensilas, denominadas áreas porosas, que actúan como órganos sensoriales. Como éstas solo se presentan en la hembra adulta puede servir para diferenciarla de la ninfa. En la cara ventral de la base del capítulo hay a veces otras apófisis denominadas aurículas (Sonenshine, 1991; Gállego, 2006).

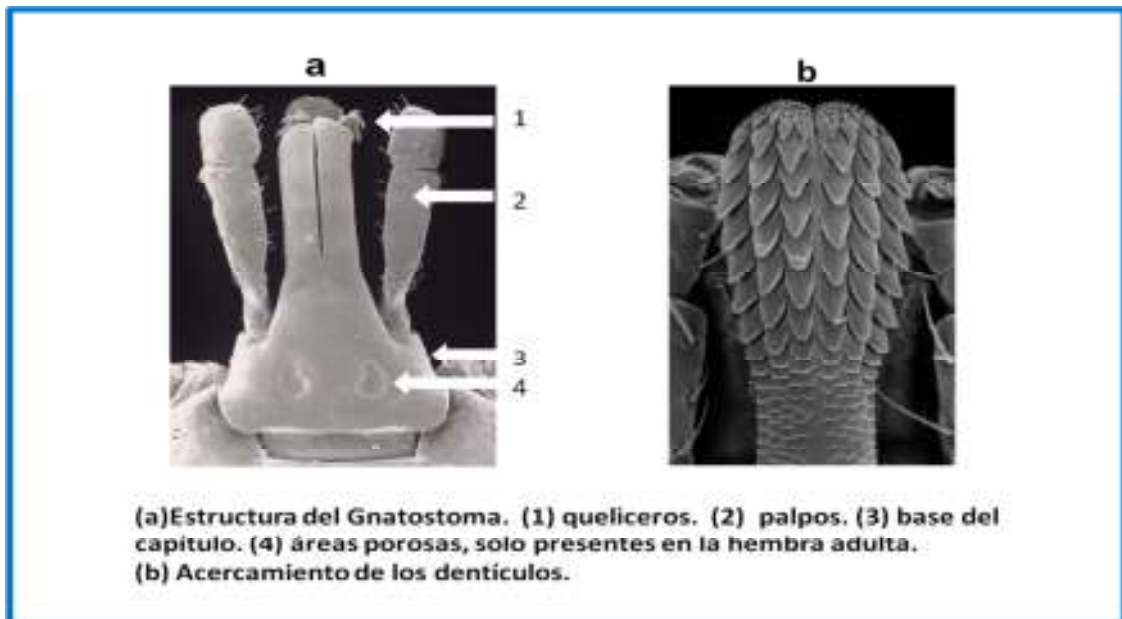


Figura 3. Estructura del Gnathostoma. (Imagen tomada de www.discoverylife.org).

Como todos los apéndices de los artrópodos las piezas del aparato bucal son quitinizadas y rígidas, y están formadas de artejos. Los palpos muy quitinizados y rígidos, están formados por cuatro artejos. Los quelíceros de tres artejos terminan en pinzas cortantes. El hipostoma, mazudo y con series de denticulos dirigidos hacia atrás está rígidamente implantando en la cara ventral del capitulum y los quelíceros están adosados a este dorsalmente constituyendo entre los tres, la apertura bucal (Gállego, 2006). Las filas de denticulos que hay en cada mitad del hipostoma en la misma serie transversa, se expresan en forma de quebrado y tienen valor taxonómico. Así pues 2/2 significa que hay dos filas de denticulos a cada lado del hipostoma (Gil-Collado, 1961).

Algunas especies de garrapatas poseen hipostomas largos que clavan firmemente en la piel, como por ejemplo: *Ixodes*, *Amblyomma* y *Hyalomma*. Otras especies más evolucionadas presentan capítulos más cortos y compensan esta característica secretando una sustancia llamada cemento que se adhiere a la piel firmemente, evitando que las estructuras bucales de la garrapata entren en contacto directo con el hospedador. Ejemplos de estas especies son: *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Haemaphysalis* (Bowman, 1999).

2. 4. 2. IDIOSOMA

El idiosoma se divide en podosoma, el cual incluye el poro genital y da sostén a las patas y opistosoma (Figura 4) que es la región posterior donde se encuentran las placas espiraculares y la apertura anal (Sonenshine, 1991).

La superficie del dorso está recubierta por el antes mencionado escudo dorsal, en el que se insertan grupos musculares importantes. En los machos, el escudo tiene generalmente unos festones visibles y en algunas especies se encuentran presentes unas láminas esclerotizadas que cubre total o parcialmente la superficie ventral. El escudo posee surcos típicos que sirven de guía para la clasificación de estos ácaros. En las hembras el escudo tiene la misma estructura, aunque es más corto, y al igual que en el resto de los estadios sólo cubre la mitad anterior. El resto del dorso está constituido por una cutícula flexible, lo que le permite expandirse durante la alimentación (Sonenshine, 1991; Gállego, 1996). La cutícula está dividida en procutícula y exocutícula (Gállego, 1996; Komplen y col., 1996).

En las garrapatas que poseen ojos, estos se localizan en el borde del escudo y a cada lado del mismo, siempre hacia el tercio anterior. Algunas veces estos órganos son prominentes como cabezas del alfiler en una depresión llamada órbita; en otros casos su convexidad es poco más o menos como la del borde del escudo y solamente pueden apreciarse como zonas transparentes y hialinas del mismo; probablemente su función sea la de distinguir la luz y el movimiento (Gállego, 1996).

En la cara ventral del idiosoma se observa la abertura genital, situada en el eje central entre el primer y segundo par de patas y el orificio anal, a nivel del cuarto par de patas, pudiendo presentar dos valvas. Ambos orificios poseen surcos característicos de valor para su clasificación taxonómica (Sonenshine, 1991; Gállego, 1996).

En la zona lateral de ambos costados y por detrás del último par de patas se distinguen los estigmas respiratorios, rodeados de una placa espiracular o peritrema. Esta estructura es casi siempre redondeada u oval en las

hembras, en tanto que en los machos tiene en muchos géneros forma de coma (Sonenshine, 1991; Gállego, 1996). En estos últimos además pueden observarse, con distinta morfología las placas anales, adanales y accesorias a cada lado del ano, las que tienen diferentes formas, pudiendo ser trapezoides y angostas, triangulares o rectangulares o bien anchas y curvas, su extremo posterior puede ser redondeado o cuadrado (Estrada-Peña y col., 2004).

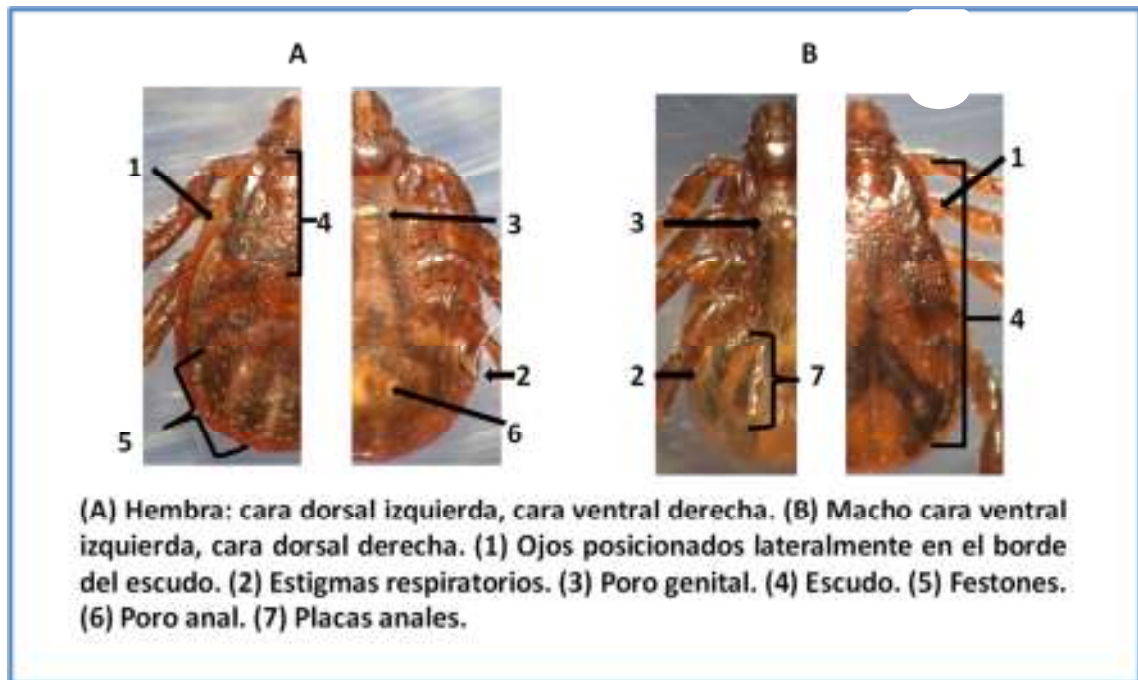


Figura 4. Vista dorsal y ventral de garrapatas ixódidas.
A: Hembra, B: Macho.

Las patas están insertas en los laterales ventrales del cuerpo por medio de las coxas. Es característica de los tarsos del primer par de patas la presencia de una depresión dorsal, en cuyo centro se abre un orificio que contiene numerosos pelos sensoriales, denominados el órgano de Haller (Gállego, 1996). En el órgano de Haller las sensilas se convierten en poros y tienen actividad quimio sensorial principalmente, aunque también pueden actuar como mecano sensores (Sonenshine, 1991). Las patas finalizan en las uñas, bajo las cuales puede apreciarse una ventosa o pulvilo adhesivo (Gil-Collado, 1961).

2.5. BIOLOGIA DE LAS GARRAPATAS

El ciclo biológico de las garrapatas ixódidas pasa por los siguientes estadios: huevo, larva, ninfa y adultos (Figura 5). Cada estadio se alimenta en una sola ocasión. La duración del ciclo está condicionada a factores abióticos o ambientales (temperatura y humedad) y a factores bióticos, tales como la abundancia y tipo de hospedadores (Bowman, 1999; Barker y Murell, 2008; Bowman y Nutall, 2008; Gern y col., 2009; Bermúdez y col., 2010). Actualmente se utiliza el término fenología para el estudio de las poblaciones de garrapatas, definiéndose como “la evolución estacional, de la densidad de garrapatas en fase de búsqueda” (Gern y col., 2008).

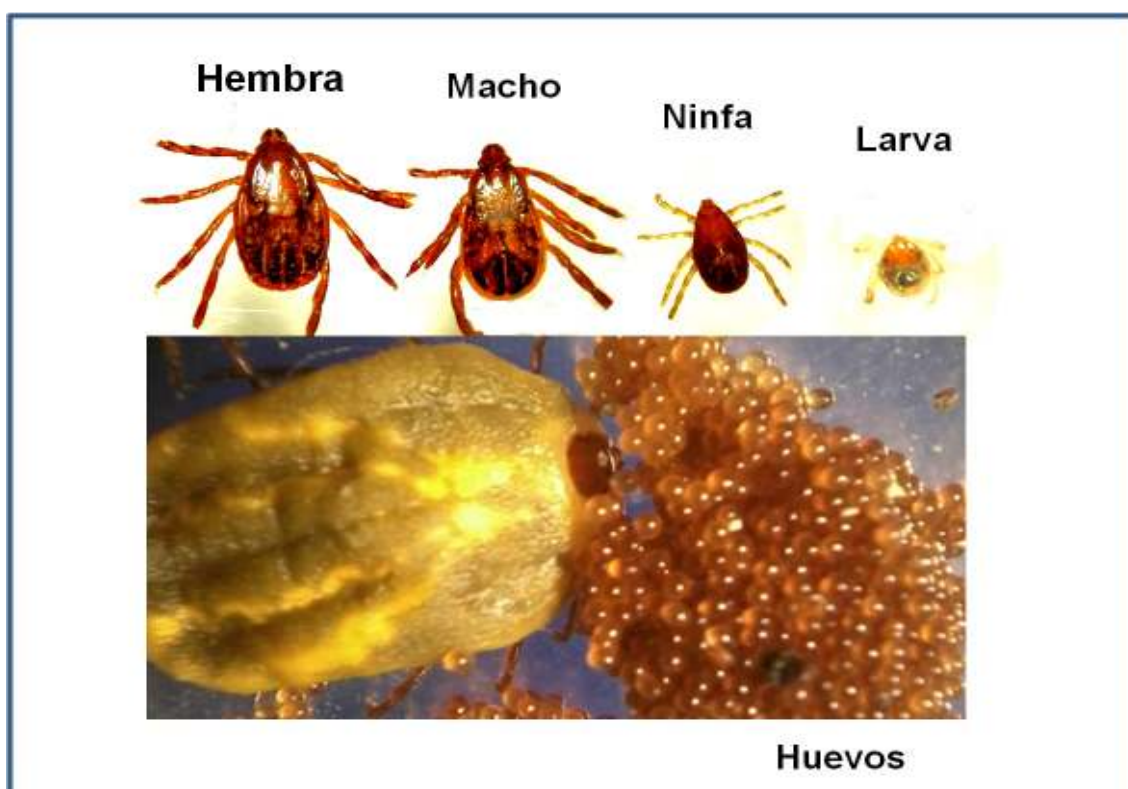


Figura 5. Estadios del ciclo biológico en garrapatas ixódidas: En sentido contrario a las manecillas del reloj. Huevo, larva (seis pares de patas), ninfa, adultos y hembra alimentada.

El primer estadio evolutivo, el huevo, es muy pequeño. Mide alrededor de medio milímetro de longitud, es de forma oval y de color ámbar. La hembra deposita los huevos formando una masa constituida por 2.000 a 12.000 huevos, dependiendo de la especie y grado de repleción. Los huevos

permanecen aglomerados debido a la acción de la secreción producida por el órgano de Gené que les aglutina y les protege de la desecación, (Harwood y James, 1993; Gállego, 1996).

La larva es de color rojizo, casi transparente. Carece de estigmas respiratorios y el aparato bucal es semejante al del adulto. La cara dorsal presenta un escudo bien visible, que recubre la mitad anterior, y a los lados de este, en las especies que poseen órganos visuales, aparecen los ojos. Sólo tienen tres pares de patas. No hay diferenciación sexual y no posee abertura genital (Sonenshine, 1991). La larva una vez nacida, busca un sitio favorable, donde esperar a un posible hospedador. Casi siempre trepa a las hierbas, se mantiene sujeta con sus patas posteriores, mientras extiende el par anterior para detectar, mediante el órgano de Haller, la proximidad de cualquier hospedador potencial. Este comportamiento se explica porque en ambientes con humedad relativa adecuada tienden a alejarse de la tierra (geotaxia negativa), lo que las lleva a trepar por las hierbas hasta su parte más alta. Sin embargo, la larva es muy sensible a la desecación y esto la hace descender al terreno en busca de humedad, para volver a trepar en cuanto ha repuesto la pérdida de agua. También son muy sensibles a las vibraciones producidas por el posible hospedador al aproximarse y a la producción de CO₂ de su cuerpo, respondiendo a estos estímulos con mucha rapidez (Harwood y James, 1994; Gállego, 1996; Komplen y col., 1996; Parola y Didier, 2001; Knap y col., 2009).

La resistencia de las lavas a la inanición es considerable, se han citado promedios de supervivencia de 400 días cuando las condiciones ambientales de humedad y temperatura son favorables (Komplen y col., 1996). El plazo se acorta notablemente cuando aumenta la temperatura y decrece la humedad. La permanencia en el hospedador para completar la alimentación puede variar, entre 3 y 13 días, dependiendo de la especie (Komplen y col., 1996).

Cuando la larva termina de nutrirse, se deja caer y busca un sitio adecuado para protegerse mientras hace la digestión y muda. Este proceso puede

tardar varios días, dependiendo de la época y especie (Gállego, 1996; Komplen y col., 1996).

La muda o ecdisis es un proceso controlado hormonalmente por esteroides llamados ecdisonas. En las garrapatas la ecdisona que regula la muda es la 20-hydroxyecdisona, la cual es sintetizada en las células Inka. La hipodermis secreta enzimas que digieren y ablandan parcialmente la endocutícula provocando que se desprenda, este proceso se conoce como apolisis. Inmediatamente comienza la formación de una nueva cutícula, primero la exocutícula y posteriormente la procutícula. Debido al aumento de la presión interna, la vieja cutícula se desgarrar y el individuo sale. La nueva cutícula tarda un tiempo en endurecerse lo que puede requerir desde un par de horas a uno o dos días (Gállego, 1996; Komplen y col., 1996; Röss, 2008).

La ninfa es el resultado de la ecdisis de la larva saciada. Es el primer estadio que posee cuatro pares de patas. Su tegumento tiene el color y la consistencia de los adultos. Su escudo dorsal sólo recubre la parte anterior del dorso. Al igual que la larva no existe diferenciación sexual y tampoco presenta gonoporo, además de carecer de las áreas porosas típicas de la hembra (Gállego, 1996). A diferencia de la larva, la ninfa posee un sistema respiratorio traqueal, cuya salida al exterior son los estigmas.

La ninfa al salir de la cubierta larvaria, observa igual conducta que la larva, alimentándose sobre el hospedador durante un periodo semejante o ligeramente superior, para volver a mudar, en este caso a adulto. El tiempo de muda es muy variable, entre 25 y 300 días. La resistencia a la inanición es también parecida a la de la larva (Gállego, 1996; Komplen y col., 1996).

El adulto surgido presenta dimorfismo sexual. Puede ser macho o hembra, lo cual en ocasiones puede observarse a simple vista por el desarrollo diferente del escudo dorsal. El sistema respiratorio es traqueal y culmina en un par de estigmas respiratorios situados lateralmente en el extremo terminal del idiosoma, tras las coxas del cuarto par de patas. Tienen un sistema nervioso central llamado singanglio que consiste de una única masa de nervios (Sonenshine, 1991). Ambos sexos ingieren sangre, pero los

machos ingieren una escasa cantidad, la cual es suficiente para subsistir hasta llegar a fecundar a la hembra. En aquellas especies en que la cópula se efectúa en el suelo, el macho no toma ningún alimento, manteniéndose a expensas de las reservas acumuladas en la fase ninfal hasta su muerte (Gállego, 1996; Komplen y col., 1996).

Por el contrario, la hembra, necesita una copiosa y prolongada alimentación sanguínea para la maduración de los huevos. Su cuerpo se hincha, hasta el extremo de que su escudo, que recubría en ayunas la mitad del dorso, apenas llega a una décima parte de la longitud del cuerpo cuando está repleta (Komplen y col., 1996).

Los adultos ixódidos usualmente se aparean sobre el hospedador. La hembra luego se alimenta hasta saciarse, se desprende, hace una copiosa y única puesta de huevos y muere, mientras que el macho puede permanecer sobre el hospedador por varios meses (Jongejan y Uilenberg, 2004).

El macho percibe mediante unos receptores localizados en el 4º artejo de los palpos, una feromona liberada por una hembra, parcialmente alimentada. Entonces rodea a la hembra con los primeros tres pares de patas, para percibir otra feromona específica producida en el poro genital de la hembra, que estimula la formación del espermatóforo. Este consiste en una bolsa de esperma que se forma en el exterior del macho mediante una pequeña gota transparente de mucopolisacáridos, que contiene proteínas en su interior, junto con el fluido seminal, el cual es eyaculado dentro de esta gota que se expande como un globo y se vuelve opaca. Finalmente, una estructura llamada endoespermatóforo sella el globo. Todo el proceso de formación de esta estructura dura alrededor de 30 segundos. El macho transfiere el espermatóforo utilizando sus quelíceros, hasta la proximidad del gonoporo de la hembra, donde inmediatamente después de haber sido colocado se evagina y toda la masa de esperma se introduce dentro del tracto genital de la hembra (Feldman-Muhsam, 1985).

La cópula es un fenómeno lento. Una misma hembra puede ostentar restos de varios espermatóforos. Se han visto hasta 5 en garrapatas *Hyalomma*, lo

que indica que ha sido fecundada por varios machos (Feldman-Muhsam, 1986).

Los machos de ixódidos pueden copular más de una vez y se ha visto que permanecen en el hospedador por varias semanas o meses esperando para volver a aparearse. En cambio la hembra una vez fecundada por uno o varios machos, termina su alimentación y desciende del hospedador (Feldman-Muhsam, 1986).

Así pues, el patrón habitual para las hembras Ixódidas, es fijarse a un hospedador, alimentarse hasta cierto límite en el que permanecen hasta la cópula, después de lo cual entran en una fase de alimentación rápida que termina en las siguientes 24 a 48 horas.

El apareamiento es necesario para completar la ovogénesis y oviposición. Asimismo la vitelogénesis no puede proceder a menos que se logre la alimentación de la hembra (Oliver, 1986; Sonenshine, 1991; Bowman, 2008). Además de la reproducción sexual se han observado casos de partenogénesis (Gil-collado, 1961; Harwood y James, 1993). El primer registro de este tipo de reproducción consta de 1912 por Argão, en especies de *Amblyomma rotundatum* Koch 1844. Así mismo, Nutall en 1923 observó el mismo fenómeno en *Rhipicephalus bursa*. Solo existe una referencia de partenogénesis en Argásidos, específicamente en *Ornithodoros moubata* hecha por Cunliffe en 1921 (citado por Davis, 1951).

Una vez que la hembra está grávida y ha terminado de nutrirse, se desprende y busca un sitio protegido en donde termina de hacer la digestión y realiza la puesta tras un periodo de preoviposición. La hojarasca, las piedras bajo las cuales pueda cobijarse, las grietas del terreno etc., constituyen los sitios de elección. El periodo de preoviposición, dura pocos días, pero durante la temporada invernal puede prolongarse varios meses debido a la diapausa (Sonenshine, 1991; Knap y col., 2009).

En el momento de la deposición de los huevos, se evagina el órgano de Gené (Figura 6), primero en forma de ampolla que sobre sale por delante la base del capítulo y los palpos, posteriormente se alarga de modo que la

lengüeta de este órgano, se pone en contacto con el huevo que emerge de la vulva, lo arrastra consigo gracias a su secreción y lo deposita en el dorso. Esta operación es lenta y laboriosa, durando de 10 días a un mes. Las hembras depositan varios miles de huevos en un solo ciclo y una vez terminado el proceso el cuerpo de la hembra queda flácido y deshinchado y posteriormente mueren (Sonenshine, 1991; Harwood y James, 1993; Gállego, 1996). La incubación de los huevos en condiciones favorables dura mes y medio, pudiendo prolongarse hasta más de medio año (Komplen y col., 1996).



Figura 6. Órgano de Gené (a) Vista ventral de la hembra donde se observa el poro genital, el órgano de Gené toma el huevo y lo transporta hacia el dorso. Los huevos son colocados uno por uno en el dorso de la hembra. (c) Vista final.

Las garrapatas duras son habitualmente exófilas, pero hay especies que se han adaptado a vivir en madrigueras o incluso en edificaciones como, *Rhipicephalus sanguineus*, que puede realizar su evolución en el interior de los locales en que viven sus hospedadores (Sonenshine, 1991; Sonenshine y col., 2002; Bowman, 2008). La mayoría de las especies son endófilas en alguna de sus fases y exófilas en su fase adulta (Cordero del Campillo, 1994).

Las garrapatas exófilas tienen un periodo de actividad bien definido controlado por los cambios de condiciones ambientales, especialmente el fotoperiodo, humedad y la temperatura ambiental. En algunas regiones donde las condiciones anteriores no varían demasiado, la actividad está regulada por la secuencia entre estación seca o de lluvias. También se ha

observado la altitud como factor importante en la actividad de las garrapatas (Sonenshine, 1991; Sonenshine y col., 2002; Gern y col., 2008; Knap y col., 2009).

La temperatura y la humedad relativa, (Schulze y col., 2001) son los dos factores ambientales mayormente estudiados, debido a la gran influencia que tienen sobre el comportamiento de búsqueda de las garrapatas. Estos varían para cada especie y en general las garrapatas se muestran más activas cuando la humedad relativa es alta y la temperatura baja. Algunas prefieren temperaturas mayores que otras.

La supervivencia de las garrapatas está fuertemente limitada a su capacidad de mantener el contenido de agua en condiciones atmosféricas desecantes. De hecho la mayoría de las veces la atmosfera no está saturada, ocasionando pérdida de agua en la garrapata. Las garrapatas hambrientas deben salir del refugio de la capa de hojarasca y humedad del suelo, para trepar en la vegetación y buscar un hospedador. Mientras esperan, se encuentran expuestas y empiezan a perder agua corporal rápidamente. Para mantener el balance de agua, las garrapatas absorben humedad activamente a través de tejidos especializados en su hipostoma. Es por esto que las garrapatas deben abandonar la fase de búsqueda, para bajar hacia el suelo y bajo la capa de hojarasca llevar a cabo la absorción de humedad (Perret y col., 2003, Gern y col., 2008, Knap y col., 2009).

Al restablecer el balance de agua, se suben a las plantas donde esperan los estímulos procedentes de un posible hospedador al que subirse. Otras corren por el suelo buscando activamente al hospedador, a estas se les llama garrapatas cazadoras, y un ejemplo son las garrapatas del género *Hyalomma*. Esta estrategia es sumamente útil en hábitats áridos donde hay poca vegetación u otras fuentes de humedad, protección y refugio (Sonenshine, 1991; Sonenshine y col., 2002). Al respecto podemos mencionar una anécdota publicada por Mann, en el magazine del Bussey Institution, en Harvard. Mann menciona haber observado, durante un viaje a Arabia, una garrapata de gran tamaño y patas largas, que se escondía bajo la escasa vegetación del área. Estas garrapatas salían de su escondite

cuando pisaba con fuerza la tierra y le perseguían activamente, moviéndose a gran velocidad, cambiando de dirección cuando él lo hacía. Más tarde dichas garrapatas fueron identificadas como *Hyalomma aegyptium*. Personalmente, nuestro equipo de trabajo puede corroborar esta historia, ya que durante los numerosos muestreos llevados a cabo, varios de nuestros miembros fueron “perseguidos” por garrapatas hambrientas. Estas garrapatas fueron después identificadas como *Hyalomma lusitanicum*.

Si las garrapatas deben regresar frecuentemente al suelo para rehidratarse, agotarán sus reservas de energía rápidamente, antes de encontrar un hospedador, y morirán (Gern y col., 2008; Knap y col., 2009).

Actualmente, considerando estos hallazgos, para el estudio de la fenología de garrapatas y otros insectos, se utiliza el déficit de saturación (SD por sus siglas en inglés), el cual integra la humedad relativa y temperatura ambiental, como medida del poder desecante de la atmósfera, (Gern y col., 2008; Knap y col., 2009). De esta manera se han publicado estudios, principalmente en *Ixodes scapularis* y *Amblyomma americanum*, donde se ha demostrado que la actividad de las garrapatas aumenta cuando disminuye el déficit de saturación y viceversa (Perret y col., 2000; Perret y col., 2003; Gern y col., 2008; Knap y col., 2009 y Tagliapietra y col., 2011). Así mismo se demostró que la longevidad de las garrapatas, especialmente los estadios inmaduros, disminuye cuando aumenta la temperatura y la humedad relativa disminuye (Knap y col., 2009; ELGhali y Hassan, 2010).

Las garrapatas endófilas viven en los nidos o madrigueras utilizados por sus hospedadores. Se refugian en grietas, cavidades o enterradas en el suelo. Estas garrapatas están perfectamente adaptadas a las condiciones específicas de los nidos. Por lo general exhiben distintos comportamientos a las exófilas como: fototropismo negativo, evitar ambientes de baja humedad relativa, son más longevas y las que parasitan animales migratorios como *Ixodes uriae*, presentan ciclos muy largos (2-4 años), adaptados a la actividad de su hospedador y época de cría (Barton y col., 1996). Estas garrapatas presentan una marcada diapausa, de la cual salen en respuesta

a los estímulos generados por el hospedador como es el CO₂, el calor corporal y algunos olores (Oliver, 1986; Sonenshine, 1991).

No existe uniformidad en cuanto a la preferencia por hospedadores. Así, hay especies que se alimentan sobre una gran variedad de hospedadores y otras que son exclusivas de un hospedador. Sin embargo, esta condición puede variar en una especie, según el estadio de desarrollo, ya que los estadios inmaduros suelen escoger animales de talla pequeña. De acuerdo a las preferencias de hospedadores, las garrapatas se clasifican en monotrópicas, ditrópicas y tritópicas (Komplen y col., 1996).

Algunas especies de garrapatas Ixódidas completan el ciclo en el mismo hospedador o diferentes hospedadores, clasificándose en monofásicas (un hospedador), difásicas (dos hospedadores) o trifásicas (tres hospedadores). Las garrapatas monofásicas mudan dos veces sobre el mismo hospedador, de larva a ninfa y de ninfa a adulto. Las garrapatas difásicas mudan una vez sobre el hospedador de larva a ninfa, la ninfa saciada se desprende y muda fuera del hospedador, el adulto resultante tiene que encontrar un segundo animal hospedador, que puede o no ser de la misma especie que el anterior. Las garrapatas trifásicas no mudan sobre el hospedador, la larva saciada se desprende y muda a ninfa, la cual tiene que encontrar un segundo animal hospedador sobre el cual se alimenta y se desprende de nuevo para mudar a adulto en el suelo, este adulto se fija a un tercer hospedador (Figura 7) (Bowman, 1999; Jongejan y Uilenberg, 2004).

En todas las garrapatas se alternan periodos de vida libre con fases de ectoparasitismo que, son variables según las especies. En cualquier caso las hembras se dejan caer siempre a tierra para efectuar la puesta de huevos; por consiguiente las larvas siempre se ven obligadas a buscar hospedadores adecuados sobre los que han de nutrirse, (Gill-Collado, 1961). Así pues las garrapatas ixódidas pasan del 94 al 97% de su vida en fase libre (Komplen y col., 1996).

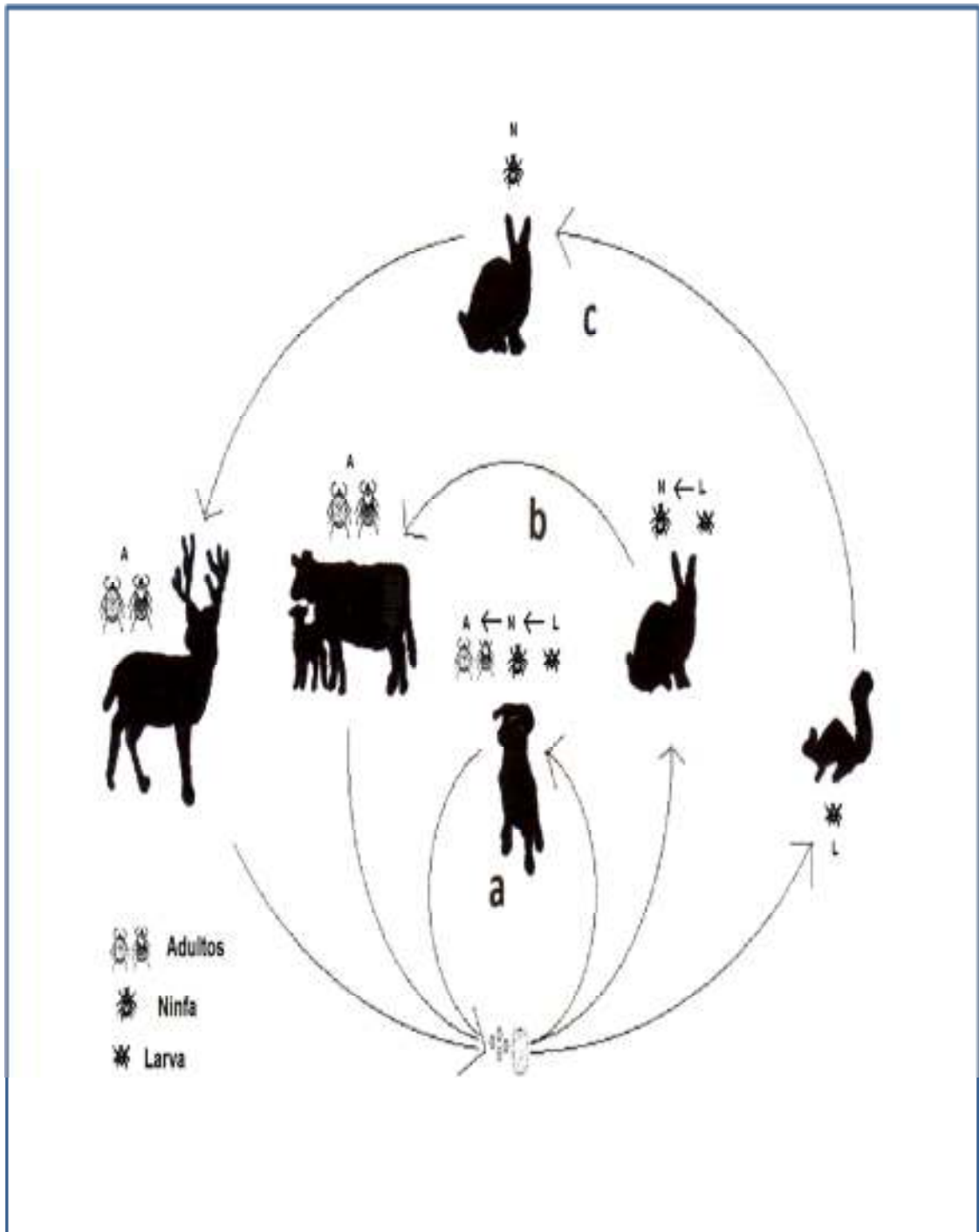


Figura 7. Ciclo biológico de la garrapata (a) Las garrapatas monofásicas se alimentan desde larva a adulto en el mismo hospedador como *R. microplus* (b) Las garrapatas difásicas mudan de larva a ninfa sobre un primer hospedador y se alimentan como adultos sobre un segundo hospedador como lo hace *R. bursa* (c) Las garrapatas trifásicas se alimentan como larvas en un hospedador, como ninfas en un segundo hospedador y como adultos en un tercer hospedador como *H. lusitanicum*. En todos los casos las hembras fecundadas se desprende y oviposita en el suelo.

Las garrapatas de dos o tres hospedadores pueden transmitir organismos causantes de enfermedades transestadialmente, es decir la infección

adquirida por una larva es llevada durante la muda al estadio ninfal y luego transmitida al hospedador en que se alimenta ésta; o bien la infección es adquirida por una larva pero es transmitida al hospedador cuando el adulto se alimenta, por lo tanto las garrapatas de tres hospedadores pueden transmitir organismos infecciosos transtadialmente a través de ambos estadios, mientras que las garrapatas de dos hospedadores están limitadas a la última fase.

En la transmisión transovárica los organismos infectantes pasan de la hembra grávida a las larvas debido a la infección en sus ovarios, un ejemplo es *Babesia bigemina*, siendo este el único mecanismo que permite a las garrapatas monofásicas ser vectores (Harwood y James, 1993; Bowman, 1999).

2.6. GARRAPATAS EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

Existen 32 especies de garrapatas documentadas en España; 10 del género *Ixodes*, 2 especies de *Dermacentor*, 5 de *Haemaphysalis*, 5 de *Rhipicephalus* y 10 de *Hyalomma* (Estrada Peña, 1994; Cordero del Campillo y col., 1994). En el centro de la Península Ibérica la especie exófila más abundante es *Hyalomma lusitanicum*, la cual constituye del 87 al 90% de las especies recolectadas de vegetación (Toledo y col., 2009). En cuanto a las garrapatas argásidas se han documentado 5 del género *Argas* y 3 de *Ornithodoros* (Tablas 1a a 1d).

Garrapata	Hospedador	Ciclo Biológico	Ecología	Distribución
<i>Argas gilcolladoi</i>	Buitre leonado	Desconocido	Desconocido	Zaragoza
<i>Argas reflexus</i>	Paloma, vencejo	Polifásico	Endófila	Andalucía, Barcelona, Burgos, Madrid, Salamanca, Toledo, Zaragoza
<i>Argas vespertilionis</i>	Quirópteros	Polifásico	Endófila	Alicante, Aragón, Barcelona, Cádiz, Canarias, Ciudad Real, Cuenca, Granada, La Rioja, Madrid, Mallorca, Soria, Tarragona, Valencia
<i>Argas persicus</i>	Gallina, rata gris	Trifásico	Exófila	Andalucía, Badajoz, Barcelona, Madrid, Salamanca, Toledo
<i>Argas transgarepinus</i>	Quiropteros	Desconocido	Desconocido	Cataluña, Granada, Teruel
<i>Dermacentor marginatus</i>	Lagomorfos, ungulados, micromamíferos, perros	Trifásico	Endófila/Exófila	General
<i>Dermacentor reticulatus</i>	Carnívoros, ungulados	Trifásico	Endófila/Exófila	Burgos, Córdoba, Galicia, La Rioja, Huesca, Menorca, Navarra, País Vasco, Salamanca
<i>Haemaphysalis concinna</i>	Mamíferos, aves, ungulados	Trifásico	Exófila	Asturias, País Vasco
<i>Haemaphysalis hispanica</i>	Lagomorfos, aves, ungulados, erizo, perro, murcéilago, lagartija	Trifásico	Endófila/Exófila	Ciudad Real, Córdoba, Huesca, Jaén, Madrid, País Vasco, Zaragoza
<i>Haemaphysalis inermis</i>	Ungulados	Trifásico	Inmaduros: Endófila Adultos: Endófila/Exófila	Barcelona, Burgos, Cantabria, Gerona, La Rioja, Navarra, País Vasco, Soria
<i>Haemaphysalis punctata</i>	Ungulados, carnívoros, liebre, ardilla roja, erizo, urraca	Trifásico	Exófila	Albacete, Andalucía, Aragón, Baleares, Canarias, Cantabria, Castilla-León, Cataluña, Cuenca, Extremadura, Galicia, La Rioja, País Vasco

Tabla 1a. Géneros y especies de garrapatas documentadas en la Península Ibérica, hospedador donde se ha observado, característica biológica y sitio de localización (Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos, Cordero del Campillo, 1994).

Garrapata	Hospedador	Ciclo Biológico	Ecología	Distribución
<i>Haemaphysalis sulcata</i>	Ungulados	Trifásico	Inmaduros: Endófila Adultos: Endófila/Exófila	Andalucía, Burgos, Canarias, Castellón, Guipúzcoa, Huesca, Madrid, Navarra
<i>Hyalomma aegyptum</i>	Vaca, oveja, cerdo	Trifásico	Exófila	Córdoba, Málaga
<i>Hyalomma anatolicum</i>	Jabali	Trifásico	Exófila	Jaén
<i>Hyalomma excavatum</i>	Ratón de campo, aves, cerdo	Trifásico	Exófila	Andalucía, León, Menorca, Pirineos orientales
<i>Hyalomma detritum</i>	Vaca, cerdo	Difásico	Exófila	Barcelona, Córdoba, Gran Canaria, Huesca, Madrid, Salamanca
<i>Hyalomma dromedarii</i>	Dromedario	Difásico/Trifásico	Exófila	Canarias
<i>Hyalomma impresum</i>	Vaca	Trifásico	Exófila	Salamanca, Sevilla
<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Ungulados, lagomorfos, perro, lirón careto	Trifásico	Inmaduros: Endófila, Adultos: Exófila	Albacete, Andalucía, Asturias, Baleares, Burgos, Canarias, Ciudad real, Extremadura, Madrid, Navarra, Toledo, Salamanca, Segovia, Zamora
<i>Hyalomma marginatum</i>	Ungulados, aves, carnívoros	Difásico/trifásico	Inmaduros: Endófila, Adultos: Exófila	Andalucía, Baleares, Ciudad real, Extremadura, León, Madrid, Navarra, Salamanca, Zamora, Zaragoza
<i>Hyalomma rufipes</i>	Vaca	Difásico	Endófila/Exófila	Córdoba
<i>Hyalomma truncatum</i>	Canarias	Perro	Difásico/Trifásico	Canarias

Tabla 1b. Géneros y especies de garrapatas documentadas en la Península Ibérica, hospedador donde se ha observado, característica biológica y sitio de localización (Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos, Cordero del Campillo, 1994).

Garrapata	Hospedador	Ciclo Biológico	Ecología	Distribución
<i>Ixodes acuminatus</i>	Roedores	Trifásico	Endófila	Asturias, Cantabria, Córdoba, Granada, Madrid, Zamora
<i>Ixodes bivarí</i>	Conejo silvestre	Trifásico	Endófila	Extremadura
<i>Ixodes canisuga</i>	Carnívoros, Jabali, ardilla roja	Trifásico	Endófila	Aragón, Barcelona, Burgos, Cáceres, Huelva, La Coruña, Navarra, Salamanca, Toledo
<i>Ixodes frontalis</i>	Aves	Trifásico	Endófila	Aragón, Canarias, Granada, País Vasco, Salamanca, Zamora
<i>Ixodes hexagonus</i>	Carnívoros, oveja, perdiz, erizo, quirópteros	Trifásico	Exófila	Aragón, Burgos, Cantabria, Cataluña, Córdoba, Galicia, Granada, Huelva, La Rioja, Madrid, País Vasco
<i>Ixodes ricinus</i>	Ungulados, carnívoros, lagomorfos, roedores, aves, quirópteros	Trifásico	Exófila	General
<i>Ixodes simplex</i>	Micromamíferos, quirópteros	Trifásico	Endófila	Aragón, Barcelona, Cantabria, La Rioja, Tarragona, Valencia
<i>Ixodes trianguliceps</i>	Roedores	Trifásico	Endófila	Aragón, Asturias, Burgos, Cantabria, León, La Rioja, País Vasco
<i>Ixodes ventralis</i>	Roedores, lagomorfos, aves, carnívoros	Trifásico	Endófila	Barcelona, Baleares, Burgos, Ciudad real, Granada, Huelva, Huesca, Jaén, Madrid, País Vasco, Zaragoza
<i>Ixodes vespertilionis</i>	Quirópteros	Trifásico	Endófila	Alicante, Aragón, Asturias, Barcelona, Cádiz, Cantabria, Castilla-La Mancha, Córdoba, Madrid, Navarra, País Vasco

Tabla 1c. Géneros y especies de garrapatas documentadas en la Península Ibérica, hospedador donde se ha observado, característica biológica y sitio de localización (Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos, Cordero del Campillo, 1994).

Garrapata	Hospedador	Ciclo Biológico	Ecología	Distribución
<i>Rhipicephalus (Boophilus) annulatus</i>	Ungulados, carnívoros, hombre	Monofásico	Exófila	Andalucía, Badajoz, Cataluña, Menorca
<i>Rhipicephalus bursa</i>	Lagomorfos, ungulados, carnívoros, erizo, hombre	Difásico	Inmaduros: Endófila Adultos: Endófila/Exófila	General
<i>Rhipicephalus pusillus</i>	Ungulados, carnívoros, lagomorfos, rata gris	Trifásico	Endófila	Ávila, Alicante, Andalucía, Aragón, Barcelona, Burgos, Ciudad real, Madrid, Salamanca, Segovia
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Carnívoros, ungulados, roedores, lagomorfos	Trifásico	Inmaduros: Endófila Adultos: Endófila/Exófila	General
<i>Rhipicephalus turanicus</i>		Trifásico	Inmaduros: Endófila Adultos: Exófila	Aragón, Ávila, Burgos, Cataluña, Extremadura, Granada, Guadalajara, Huelva, Jaén, León, Madrid, Menorca, País Vasco, Salamanca
<i>Ornithodoros coniceps</i>	Paloma	Polifásico	Exófila	Burgos, Madrid
<i>Ornithodinus erraticus</i>	Cerdo, hombre (accidental)	Polifásico	Endófila	Andalucía, Ávila, Extremadura, Salamanca, Toledo
<i>Ornithodoros salahi</i>	Murciélago	Polifásico	Exófila	Barcelona

Tabla 1d. Géneros y especies de garrapatas documentadas en la Península Ibérica, hospedador donde se ha observado, característica biológica y sitio de localización (Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos, Cordero del Campillo, 1994).

2.6.1. GÉNERO *Hyalomma*

Este género contiene al menos 21 especies, que probablemente se originaron en las zonas bajas semidesérticas o estepas del centro de Asia. Es el más abundante en el ganado doméstico (incluyendo camellos), en zonas del centro y sur de la Península e Islas Canarias. Son especialmente abundantes en biotipos templados, áridos y semiáridos, generalmente de altitudes bajas a medias, y en aquellos con temporadas secas prolongadas. Alrededor de la mitad de las especies conocidas de *Hyalomma* son

importantes vectores de agentes infecciosos para el ganado y ser humano (Harwood y James, 1993). La mayoría de las garrapatas de este género presentan ciclos trifásicos, pero algunas son monofásicas o difásicas, tal es el caso de *H. marginatum*, la cual es difásica. Algunas garrapatas de este género pueden cambiar de ciclo dependiendo de la temperatura y tipo de hospedador, tal es el caso de *H. dromedari* (Alahmed y Kheir, 2003).

El género *Hyalomma* está representado por garrapatas de tamaño medio a grande, sin ornamentación. Con ojos típicamente orbitados, rostro largo y el surco anal en forma U. Los machos, además de las placas anales y adanales, presentan otras subanales, y a veces otras pequeñas supernumerarias en la parte posterior del cuerpo (Harwood y James, 1993; Bowman, 1999; Jongejan y Uilenberg, 2004).

Las especies de *Hyalomma* parasitan animales mamíferos domésticos y silvestres y también aves y reptiles. Las larvas y ninfas parasitan con frecuencia a reptiles, pequeños roedores y aves, mientras que los adultos son más bien propios de grandes mamíferos, aunque hay especies parásitas de tortugas. A diferencia de otras garrapatas ixódidas que esperan sobre la vegetación a que pase un hospedador, los adultos de *Hyalomma* pueden también buscar activamente a su hospedador saliendo de sus escondites cuando este se aproxima (Gil-Collado, 1961; Harwood y James, 1993; Jongejan y Uilenberg, 2004).

2.6.2. *Hyalomma lusitanicum*

La descripción original de esta especie se dio con base al análisis de especímenes provenientes de Portugal, siendo descrita por primera vez como especie independiente en 1844 (Koch), constituyendo esta la primera referencia acerca de su existencia en la Península Ibérica. Posteriormente también Schulze & Schlotte (1929) aludirían nuevamente a su presencia proponiendo la creación de la sub especie *H. lusitanicum cicatricosum*, con base a la observación de especímenes caracterizados por un escudo dorsal con puntuaciones gruesas e irregularmente distribuidas, subespecie que

posteriormente se consideró sinónimo de *H. lusitanicum* y fue re-descrita en 1955 por Tendeiro (Travassos, 1994; Apanaskevich y col., 2008).

En España, Gil-Collado (1936) en su primer estudio sobre los Ixódidos en este país, señaló la existencia de *H. lusitanicum*, apuntando como hospedadores a *Dama dama*, y *Cervus elaphus* e indicando las siguientes localidades: Madrid, El Pardo, El Escorial, Robledo de Chavela, Barajas, Salamanca, Calzada, Albufera de Valencia y Riofrío. Tales datos fueron después repetidos en 1948 en otro escrito elaborado por Gil Collado sobre los Ixódidos en España (Travassos, 1994).

Hyalomma lusitanicum es una garrapata trifásica, endo-exofílica y ditrópica, siendo una especie propia de clima mediterráneo (Travassos, 1994; Apanaskevich y col., 2008).

Los principales hospedadores para los adultos son una variedad de ungulados domésticos y silvestres de talla mediana a grande, ganado bovino, ovino, equino, caprino, porcino, camélidos, jabalíes, venados y corzo. Así mismo se han recolectado adultos en perros, conejos águilas y humanos. Las larvas y ninfas se alimentan sobre lepóridos por lo que coinciden con ellos en su distribución (Travassos, 1994; Apanaskevich y col., 2008).

La característica endofílica de las formas inmaduras de *H. lusitanicum*, hace que se mantenga en los locales de abrigo de los referidos mamíferos. Por otro lado el biotopo favorable a las formas adultas coincide con los campos de pastoreo de los rumiantes domésticos, donde aquellas deambulan activamente en busca de sus fuentes de alimentación predilectas. La actividad de los adultos en la Península Ibérica, alcanza su máximo en la época estival (entre mayo y agosto), mientras que las formas larvarias y ninfales pueden encontrarse entre abril y octubre (Travassos, 1994; Sobrino y col., 2012).

Hasta hace relativamente poco (1970), se desconocía papel de *H. lusitanicum* en la transmisión de patógenos, Tendeiro (1972) refería la posibilidad de que fuera reservorio de *Coxiella burnetii* (Derrick, 1939). Más

recientemente García-Fernández y col., (1991), demostraron su capacidad como vector de *Theileria annulata* y posteriormente, también de *T. equi* (Travassos, 1994; Apanaskevich y col., 2008). En años recientes Toledo y colaboradores detectaron molecularmente la presencia de varios organismos zoonóticos en *H. lusitanicum* (Toledo y Olmeda, 2008).

2.7. IMPORTANCIA DE LAS GARRAPATAS

Alrededor del 80% del ganado del mundo está infestado con garrapatas, por lo cual se consideran como la ectoparasitosis del ganado de mayor repercusión económica. Las garrapatas más importantes desde este punto de vista pertenecen a los siguientes géneros: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes* y *Rhipicephalus*, incluyendo en este último el recientemente renombrado subgénero *Boophilus* (Polar y col., 2008).

La importancia médica y veterinaria de las garrapatas se debe a su acción patógena directa, ya que por su forma de alimentación puede provocar anemia, disminución de la ganancia de peso, y en algunos casos extremos la muerte (Jongejan y Uilenberg, 2004; Gosh y col., 2007; Polar y col., 2008). La pérdida de sangre ocasionada por garrapatas adultas al alimentarse, particularmente las hembras, puede ocasionar otras pérdidas económicas por la ya mencionada reducción de la ganancia de peso, disminución de la producción de leche o daños en las pieles. Jellison, trabajando con *Dermacentor andersoni*, comprobó que bastan ochenta adultos para matar un conejo en cinco a siete días (Komplen y col., 1996; Ghosh y col., 2007; Polar y col., 2008).

Las perforaciones ocasionadas a las pieles por las picaduras de las garrapatas disminuye el valor de estas hasta un 20-30% (Komplen y col., 1996; Ghosh y col., 2007; Polar y col., 2008). Así mismo la picadura puede dar lugar a infecciones bacterianas secundarias y abscesos, lo cual puede ocasionar pérdida de ubres, incrementando la mortalidad de los becerros (Jongejan y Uilenberg, 2004).

La saliva de algunas especies de garrapatas contiene toxinas que pueden causar parálisis, toxicosis, irritación y alergias. Ejemplos de éstas son *D. andersoni*, *I. rubicundus* e *I. holocyclus* (Jongejan y Uilenberg, 2004; Barandika y col., 2008).

Sin embargo la principal razón de las pérdidas económicas por infestación por garrapatas se debe al gran número y variedad de enfermedades que pueden transmitir (Bowman, 1999). Así pues de forma indirecta los daños que las garrapatas ocasionan se deben principalmente a su papel como vectores de organismos infecciosos y parasitarios (Komplen y col., 1996; Polar y col., 2008). Además de su papel vectorial, las garrapatas actúan como reservorios. Entre los microorganismos patógenos que transmiten podemos mencionar bacterias, protozoarios, virus e incluso nematodos (Jongejan y Uilenberg, 2004; Barandika y col., 2008). Siendo las más importantes económicamente: la babesiosis, la theileriosis (particularmente en países en desarrollo), la anaplasmosis causada por *Anaplasma marginale*, la coudriosis y la ehrlichiosis (FAO, 2002; Jongejan y Uilenberg, 2004; Bowman y Nutall, 2008).

Más de 40 especies de garrapatas están naturalmente infectadas con *Coxiella burnetii*, así mismo se ha demostrado que las garrapatas *H. lusitanicum* y *D. marginatus* son reservorios de *Coxiella burnetii* en el norte y centro de España. *Ixodes ricinus* se considera vector de *Anaplasma phagocytophilum*, *B. burgdorferi* y *C. burnetii* (Barandika y col., 2008; Toledo y col., 2009).

Ya en 1952 el Departamento de Agricultura de Estados Unidos en su anuario relativo al quinquenio 1940-1944 estimaba la pérdida económica asociada a garrapatas en 6,5 millones de dólares (Gil-Collado, 1961). Más recientemente De Castro estimó el costo total de las garrapatas y las enfermedades transmitidas por garrapatas en ganado entre 14 y 19 mil millones de dólares anuales globalmente (Willadsen, 1991; Gosh y col., 2007).

Young y otros investigadores consideraron que el control de garrapatas y las enfermedades transmitidas por garrapatas es el problema de salud y

manejo más importante en África, representando un problema de igual o mayor magnitud que la tripanosomosis y la mosca tsé-tsé (Jongejan y Uilenberg, 2004).

Por todo lo anteriormente mencionado se puede declarar que especialmente en los países en vías de desarrollo, el impacto de las garrapatas sobre la ganadería es un factor contribuyente a la pobreza (Bowman y Nutall, 2008).

Aun cuando la infestación por garrapatas tiene para la ganadería importancia económica global, hay también un creciente impacto en la salud pública, principalmente en el hemisferio norte debido a la enfermedad de Lyme (Lyme borreliosis) y otras enfermedades emergentes o re-emergentes como son la encefalitis vírica, anaplasmosis, babesiosis, fiebre hemorrágica de Crimea Congo (la cual es transmitida por *Hyalomma spp*), así como la encefalitis de primavera-verano rusa, y la enfermedad del bosque de Kyasanur (Jongejan y Uilenberg, 2004; Barandika y col., 2008; Bowman y Nutall, 2008).

La enfermedad de Lyme, causada por *Borrelia burgdorferi sensu lato*, es transmitida por garrapatas del género *Ixodes* al humano y a los animales y se considera actualmente como la enfermedad transmitida por artrópodos más común en Norte América y Europa (Jongejan y Uilenberg, 2004; Barandika y col., 2008).

En resumen el efecto de las enfermedades transmitidas por garrapatas ocasiona una gran pérdida económica a la industria ganadera en el mundo y un gran riesgo para la salud humana. Lo que ha demandado el establecimiento de medidas de control de esta plaga.

Actualmente el control de las plagas descansa en el uso continuo de acaricidas sobre el hospedador y en el ambiente. El uso a largo plazo de esos químicos está llevando al desarrollo de resistencias y generando el problema de sus residuos en los productos ganaderos y el medio, entre otros efectos indeseados (Gosh y col., 2007). A continuación pasaremos a exponer los métodos de control.

2.8. MÉTODOS DE CONTROL DE GARRAPATAS

Como se exponía en el epígrafe anterior, el control de las infestaciones por garrapatas es necesario, existen numerosos planes de control los cuales descansan en el uso continuo de acaricidas.

Haciendo una revisión retrospectiva de las estrategias de control implementadas en los últimos 50 años, el inicio se da principios del siglo XX, cuando se utilizaban sustancias químicas para exterminar estos parásitos del ganado. En 1961 Gil-Collado decía: “No existen en realidad repelentes seguros contra estos ácaros”. En esa época King ensayó una serie de sustancias para la protección de la picadura a personas, como N-butilcetanilida, mandelato de hexilo, indalona, N-propilacetanilida y ácido undecilénico, refiriendo que todos estos productos concedían una protección de más de diez días (Gil-Collado, 1961).

Desde aproximadamente 1983 las autoridades en salud animal en Estados Unidos, Australia y el sur de África trataban al ganado con una variedad de agentes químicos en un esfuerzo por controlar la población de garrapatas (George y col., 2008a). A partir de entonces las estrategias han sido muy variadas y con resultados muy variables.

En ciertas zonas, se ha llevado a cabo programas de control exitosos, como el desarrollado por la FAO en el Caribe para *Amblyomma variegatum*, vector de *Cowdria ruminantium*. Este consiste en la aplicación de tratamientos químicos cada dos semanas a todos los vacunos de las islas durante dos años. Así se han conseguido islas “Provisionalmente Libres” (FAO, 2002).

En México con el objetivo de erradicar *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, en los estados fronterizos con Los Estados Unidos de Norteamérica, se implantó la Norma Oficial Mexicana, denominada NOM-EM-004-ZOO/1994, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de mayo de 1995, bajo el nombre “Campaña nacional para el control de la garrapata *Boophilus microplus*”. El éxito de esta empresa ha sido moderado por lo que fue revisada en 1998, y habiéndose detectado focos aislados de resistencia a los acaricidas químicos fue modificada en 2012 (DOF., 2012). La

mencionada Norma Oficial, establece la legalidad y líneas de acción del uso de productos acaricidas, estableciendo estrategias para el control de las garrapatas y los aspectos relacionados con las enfermedades que transmiten, métodos de control, usos de productos ixodicidas, estrategias para el reconocimiento, prevención y control de la resistencia, vigilancia epidemiológica, medidas cuarentenarias y el control de la movilización de animales (Ordoñez y col., 2012).

Otros programas exitosos de erradicación de garrapatas se desarrollaron en algunas áreas geográficas subtropicales ecológicamente marginales, como son el caso del sur de Estados Unidos y centro de Argentina, donde *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y la babesiosis fueron erradicados (Jongejan y Uilenberg, 2004). Otro caso se dio en África del sur, donde la fiebre de la Costa Este (causada por *Theileria parva parva*) fue exitosamente erradicada. Sin embargo en áreas tropicales ecológicamente más favorables, como el noreste de Australia, América central, las islas del Caribe y el este de África los resultados no fueron tan buenos. En estos sitios donde la erradicación no ha sido posible, el coste de mantener programas de control intensivo se ha vuelto prohibitivo, por esto es necesario implementar estrategias de control integrado.

Así pues, la lucha contra las diferentes fases de las garrapatas continúa en la actualidad. El abordaje para el control de garrapatas debe tener en cuenta su fenología. El procedimiento en fases libres es distinto según se trate de especies de hábitos semi domésticos o de campo abierto.

2.8.1. CONTROL EN EL MEDIO

Los métodos de lucha frente a las garrapatas en el medio, son fundamentales en aquellas especies de varios hospedadores que pasan un tiempo en el suelo, o si se pretende actuar en el momento de la oviposición de las hembras. Estos métodos se centran en el control de los estadios no parásitos del ciclo.

2.8.1.1. Prácticas tradicionales

Debido a que las garrapatas en fases libres requieren condiciones específicas de microclima y están por lo tanto restringidas a micro hábitats particulares dentro del ecosistema en que habitan con sus hospedadores, la destrucción de estos ayuda a reducir la población de garrapatas (Merck, 2008).

En este sentido la quema de pastos es una de las prácticas más antiguas y que aún se lleva a cabo con dos objetivos: acelerar el reverdecimiento de las áreas y reducir la población de garrapatas. El valor de las quemas controladas de pastos para reducir la población de garrapatas varía considerablemente, dependiendo de muchos factores tales como, localidades, especies de garrapatas, tipos de suelo y pasto. Esta práctica se realiza ampliamente en África, Australia y América y es un componente importante del programa gubernamental para el control integrado de garrapatas en Cuba. Diferentes ensayos llevados a cabo sobre la efectividad de la quema controlada de pastos han arrojado resultados opuestos, así pues en algunos casos como en Mozambique, Zambia y Estados Unidos demostraron una reducción de la población de garrapatas después de la quema, aunque se observó que en este último país la reducción era temporal, con una duración de aproximadamente 1 año, hasta que las garrapatas volvieron a colonizar las áreas quemadas (Jonsson, 2004). Sin embargo en otros ensayos no se observó efecto en la abundancia de garrapatas ixódidas en vegetación, la cual se mantuvo igual que en las áreas no quemadas y en ocasiones la quema controlada tuvo un efecto de incremento en la población, particularmente de los estadios inmaduros (Allan, 2009; Padgett y col., 2009).

En el sureste de Estados Unidos, la alteración del hábitat de las garrapatas se lleva a cabo destruyendo cierto tipo de vegetación para el control de *Amblyomma americanum* en áreas recreativas. La misma estrategia se utiliza en Sudáfrica para el control de *Ixodes rubicundus*. La modificación del ambiente se hace eliminando hierbas y arbustos que las garrapatas utilizan como refugio, hojas sueltas de los árboles, grietas en las instalaciones para

animales y cuando es posible, cambiando el tipo de suelo de los senderos por los que transitan los animales y las personas (Jonsson, 2004; Merck, 2008).

Para el ganado criado bajo sistema extensivo, se aplican estrategias como la rotación de áreas de pastoreo, manteniendo a los animales alejados del pasto infestado durante el tiempo suficiente para que las garrapatas mueran de inanición. Los animales que vuelven a dichos campos después de un tiempo prudencial, deben ser tratados con anterioridad para que no lleven garrapatas que pudieran volver a infestarlos. Esta estrategia se utiliza para el control de garrapatas Ixódidas específicas de un solo hospedador como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sin embargo, tiene poca utilidad para las especies de múltiples hospedadores o que puedan alimentarse sobre animales silvestres, debido al prolongado período de vida de larvas y adultos no alimentados (Merck, 2008; Polar y col., 2008).

2.8.1.2. Reducción de hospedadores

Otra estrategia en uso, para reducir la abundancia de garrapatas es la eliminación de hospedadores de estadios inmaduros o en algunos casos de adultos. Esta técnica se ha utilizado ocasionalmente para el control de garrapatas trifásicas como *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma hebraeum* e *Ixodes rubicundus* en África y de *Hyalomma spp* en el sureste de Europa y Asia (Merck, 2008). Así mismo en algunas comunidades de Estados Unidos, se han implementado programas de caza de ciervos, para disminuir el número de estos, ya que son el hospedador principal de *Ixodes scapularis*, vector de la enfermedad de Lyme. También existen programas de control de la población de ratones silvestres que son los hospedadores de las formas inmaduras de esta garrapata. Se han diseñado diferentes estrategias para reducir el número de ratones y otros hospedadores de las formas inmaduras, como son la colocación de trampas y la introducción de depredadores, aunque esta última requiere una cuidadosa evaluación (Stafford, 2004).

2.8.1.3. Aplicación de productos químicos

En este sentido, tiene especial relevancia el tipo de ciclo de las garrapatas a controlar. En las de ciclo endófilo, uno de los principales métodos de control de la población de garrapatas es la limpieza y aplicación de desinfectantes, como fenoles-cresoles a las perreras (en el caso de *R. sanguineus*) o los establos (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). También pueden utilizarse la impregnación de los locales con insecticidas de acción residual prolongada.

En el control de las garrapatas exófilas, la aplicación ambiental en general tiene una eficacia mucho más limitada y por eso, es necesario definir, dependiendo de la fenología de la especie a tratar, el lugar de aplicación. Así, en las zonas de Estados Unidos donde *Ixodes scapularis* es abundante, se han desarrollado métodos de aplicación ambiental adaptados a su ciclo (Figura 8). Uno de los métodos consiste en la colocación, en lugares estratégicos de cilindros de cartón biodegradables con algodón impregnado en amitraz en su interior (Damminix Tick Tubes®) con la seguridad de que los ratones de campo, hospedadores de los estadios inmaduros de las garrapatas, recogerán el algodón tratado y lo introducirán en su nido protegiéndose así de la infestación. Para el control de la infestación de ciervos por adultos, se ha desarrollado un comedero adaptado con postes impregnados de un acaricida químico, (Four posters acaricide applicators), de manera que cuando los ciervos introducen la cabeza para alimentarse, el cuello y cuernos se impregnan del acaricida y de esta manera se mantienen protegidos contra las garrapatas (Stafford, 2004). Este mecanismo es comercializado en Estados Unidos y existe una lista de acaricidas aprobados por la Environment Protection Agency (EPA), para ser aplicados en los rodillos y administrados a los ciervos, formulados a base de permetrina al 10% (Stafford, 2004).

En el caso de roedores los mejores resultados se han obtenido mediante el uso de una caja sellada que en su interior contiene un cebo sumamente atractivo para ratones y ardillas. Al introducirse para comer pasan por un área donde se encuentra una pequeña cortina impregnada con acaricidas,

aplicándose al animal a su paso al entrar y salir. Este mecanismo se comercializa bajo el nombre de Maxforce ® TMS (Bayer) y ha sido autorizado por la EPA desde el año 2003.

Existen otras prácticas, habitualmente desarrolladas para el control de otros ácaros, como la aplicación de acaricidas en rascaderos o polveras, que en general tienen poca eficacia.

La aplicación directa en suelo, suele realizarse en áreas específicas, por ejemplo en Estados Unidos a lo largo de los senderos en parque naturales, con el fin de proteger a las personas que transitan por ellos. Por lo común se utilizan emulsiones acuosas aplicadas (con acaricidas químicos aprobados por la legislación de cada país) en aerosol (Merck, 2008).



Figura 8. Diferentes dispositivos para el control de garrapatas en animales silvestres. a) y d) Aplicadores de acaricidas de 4 postes. b) y e) Maxforce ® para roedores, c) y f) Damminix Tick Tubes ® para ratones.

Finalmente, el uso de repelentes aplicados directamente en el hospedador es una de las herramientas más utilizadas y con mayor aceptación sobre todo para su uso de humanos. Con el fin de protegerse durante las exposiciones ya sea por actividades laborales o bien durante las actividades recreativas. En este caso el DEET (N,N diethyl-*m*-toluamide) es el repelente contra artrópodos e insectos más ampliamente utilizado. Durante más de 50

años este compuesto ha sido la sustancia activa más ampliamente utilizada para la formulación de repelentes (Salafsky y col., 2000; Witting-Bissinger, 2009). Originalmente fue desarrollado por el ejército americano durante la segunda guerra mundial y aunque se utiliza desde 1946, su uso por la población civil inició en 1957. Se comercializa bajo numerosos nombres como repelente contra mosquitos y garrapatas, existiendo alrededor de 230 registrados en la EPA que contienen este principio activo (Stafford, 2004) y aunque se ha demostrado que este químico es muy efectivo contra mosquitos, puede ser menos repelente contra garrapatas comparado con los repelentes que contienen permetrina o piperidina. El DEET es considerado el estándar de referencia para los repelentes y es el producto comercial más ampliamente distribuido y mejor conocido, por lo que los nuevos productos repelentes siempre son comparados a este (Bissinger y col., 2009). Sin embargo a pesar de su eficacia y su seguridad, se sabe que este producto se absorbe rápidamente a través de la piel y existen algunos casos documentados de toxicidad asociada a su uso tanto en humanos como en animales. De igual manera no se recomienda su uso en niños menores de dos años. Actualmente se están evaluando nuevos vehículos, como los liposomas cargados positivamente, que permiten prolongar la acción del efecto repelente y al mismo tiempo disminuir la absorción a través de la piel, lo cual aumentaría la eficacia y seguridad de este compuesto (Salafsky y col., 2000).

2.8.2. LUCHA BIOLÓGICA

La naturaleza ha desarrollado una serie de métodos biológicos de control de las poblaciones de ixódidos. Este hecho no ha pasado desapercibido para los investigadores quienes desde principios del siglo XX han documentado numerosos agentes de biocontrol de garrapatas, incluyendo ciertos microorganismos patógenos, parasitoides y depredadores (Samish y col., 2004). Así pues, teniendo en cuenta esta nueva estrategia, en años recientes se ha desarrollado el concepto de lucha biológica o control biológico, el cual se entiende como: La acción ejercida por parásitos,

depredadores o patógenos, para mantener la densidad de la población de otros organismos en niveles más bajos de los que existirían sin la acción de estos enemigos naturales (CTCB, 2009). En el año 1995 surge la Organización Internacional de Lucha Biológica (IOBC por sus siglas en inglés: International Organization for Biological Control) que promueve métodos ambientalmente seguros para el control de plagas y enfermedades. Ellos definen control biológico como “La utilización de organismos vivos o sus productos, para impedir o reducir (no eliminar) las pérdidas o daños ocasionados por los organismos nocivos” (OIBC, 2013).

El uso de organismos vivos para el control de plagas, ha tenido una gran difusión en agricultura, sin embargo, la complejidad de su desarrollo y utilización en veterinaria ha limitado mucho su aplicabilidad.

El problema más difícil de resolver continúa siendo el paso de los productos del laboratorio a las condiciones existentes en el campo, donde deben adaptarse, ser eficientes y sobre todo ser fácilmente aplicables en la práctica de las condiciones ganaderas (Jongejan y Uilenberg, 2004; Willadsen, 2006).

2.8 2.1. Depredadores

Aun cuando las garrapatas tienen pocos enemigos naturales, son susceptibles a la depredación, especialmente los especímenes alimentados en búsqueda de un sitio para mudar o mayormente las hembras repletas que buscan un sitio para realizar la puesta (Samish y col., 2004; de la Fuente y Kocan, 2006).

Algunos depredadores naturales de las garrapatas son arañas, hormigas, roedores, lagartijas y aves, que contribuyen a limitar la población de estas, sin embargo solo unas pocas especies han sido evaluadas como agentes de biocontrol (Samish y Rehacek, 1999; Samish y Glazer, 2004).

En el caso de las aves, se han documentado alrededor de 50 especies que ingieren garrapatas, sin embargo solo unas pocas se alimentan

exclusivamente de ellas, siendo el resto consumidores ocasionales. Uno de los muchos ejemplos de depredadores naturales que se pueden mencionar son los famosos pinzones terrestres grandes de Darwin (*Geospiza spp*), las cuales presentan un pico perfectamente adaptado a su alimentación de semillas y garrapatas que recogen de sus hospedadores como tortugas gigantes (*Geochelone nigra*), iguanas terrestres (*Conolophus subcristatus*) y marinas (*Amblyrhynchus cristatus*) de las Islas Galápagos (Sazima y Sazima, 2010)

En diferentes ensayos científicos publicados se menciona el uso y evaluación para el control de la población de garrapatas de aves, como el picabuey (*Buphagus africanus* y *B. erythrorhynchus*), únicas aves que se conoce se alimentan exclusivamente de ectoparásitos y preferentemente de garrapatas (Stutterheim y col., 1988). Desafortunadamente la población de estas aves ha disminuido debido a factores como el uso de acaricidas que son tóxicos para ellas. Se han hecho notables esfuerzos para su reintroducción y se considera que juegan un papel importante como parte de programas de Control Integrado de Plagas (IPM por sus siglas en inglés Integrated Pest Management). En años posteriores se publicaron observaciones donde se menciona que estas aves pueden ocasionar daño al ganado dado que tienden a alimentarse de heridas de la piel contribuyendo a mantenerlas abiertas (Weeks, 2000) factor que deberá evaluarse a mayor profundidad.

En África las gallinas (*Gallus gallus*) confinadas con el ganado fueron observadas ingiriendo garrapatas (Dreyer y col., 1997), pero dado que no son depredadores específicos u obligatorios de las garrapatas, su consumo depende en gran medida de la disponibilidad de otras fuentes de alimento y de la densidad de población de garrapatas, por lo tanto es poco probable que ayuden a reducir la población de estas, aunque se considera que en pequeñas granjas de tipo mixto puedan contribuir a mantener la población dentro de ciertos límites (Samish y col., 2004).

Algunas observaciones sugieren que en ciertos hábitats ecológicos los artrópodos juegan un papel importante en el control de la población de

garrapatas. La depredación por artrópodos se da principalmente por hormigas de fuego (*Pheidole megacephala*), escarabajos de tierra (*Carabidae*) y arañas (*Teutana* spp), los cuales parecen ser los mayores depredadores de estas, siendo las hembras alimentadas las preferidas (Samish y Alekseev, 2001). Se han documentado nueve géneros de arañas que cazan garrapatas. Las arañas saltadoras (*Salticidae*) en particular son conocidas depredadoras de ciertas garrapatas Argásidas y las arañas lobo (*Lycosidae*) de ixódidas. La araña tejedora *Teutana triangulosa* es un depredador común de *R. sanguineus* (Samish y Rehacek, 1999).

En España, Castellá Espuny (1998) documentó la presencia de arañas del género *Teutana* alimentándose de hembras repletas de *R. sanguineus*, picando a través de la cutícula y en ocasiones arrancando las patas para ingerir la hemolinfa hasta ocasionarles la muerte.

Se sabe que las hormigas son depredadores de garrapatas, principalmente las hormigas de los géneros *Aphaenogaster*, *Iridomyrmex*, *Monomorium*, *Pheidole* y *Solenopsis*, las cuales han sido documentadas cazando garrapatas *Argas miniatus*, *Rhipicephalus annulatus*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, *Otobius meгинi* y *Otobius moubata*. En México, en un ensayo controlado, la hormiga de fuego *Solenopsis germinata* consumió 63-100% de hembras alimentadas de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Butler y col., 1979). En general se ha observado que en los hábitats infestados, la población de garrapatas disminuye cuando se introducen hormigas de los citados géneros (Samish y Rehacek, 1999).

Aun cuando los depredadores contribuyen enormemente a la disminución de la población de garrapatas, casi ninguno de ellos se alimenta exclusivamente de garrapatas, excepto quizá el picabuey, por lo que su introducción en nuevas zonas no garantiza el éxito en el control y por el contrario constituye un riesgo para el equilibrio natural. Sin embargo es muy recomendable la conservación y de ser posible el aumento de las poblaciones de los depredadores ya existentes de forma natural.

2.8.2.2. Parasitoides

La mayoría de los parasitoides utilizados para el control biológico de insectos en plantas pertenecen al orden *Hymenoptera*, y tienen un éxito notable para el control de plagas en agricultura, sin embargo solo unas pocas especies afectan a las garrapatas. La primera descripción de garrapatas parasitadas por avispas fue dada a conocer por Howard en Texas en 1907 y 1908, que las incluyó dentro del género *Ixodiphagus* de la familia Encyrtidae con 7 especies que afectan a garrapatas. La especie más ampliamente distribuida es *Ixodiphagus hookeri*, anteriormente conocida como *Hunterella hookeri* e *Ixodiphagus caucurtei*, las cuales han sido documentadas en Asia, África, Norte América y Europa (Samish y col., 2004).

Ixodiphagus hookeri es una avispa diminuta que oviposita en ninfas alimentadas, y esporádicamente en hembras grávidas. En Castilla la Mancha se han observado parasitando ninfas de *R. bursa* y de *R. sanguineus* en Venezuela, donde se considera como una opción viable de control biológico (Foldvari y col., 2000; Coronado, 2008; Coronado y col., 2008). Además de la cita de Folvari y colaboradores, también en España se identificó en *Haemaphysalis punctata* (Estrada Peña y Sánchez Acedo, 1989). Las larvas de esta avispa se alimentan de los tejidos de las garrapatas y mudan en su interior emergiendo como adultos y produciendo la muerte del hospedador.

Así pues, esta es la única especie que ha sido liberada para el control biológico de garrapatas. En la Isla de Naushon, Massachusetts, USA, se liberaron ejemplares de esta especie en 1928 y aunque se observó una disminución de la población de garrapatas el año siguiente, 12 años después *D. variabilis* e *I. scapularis* siguen siendo muy comunes en el sitio a pesar de que la avispa está aún presente (Cobb, 1942; Samish y col., 2004). En 1943 se llevó acabo un experimento similar en dos áreas de Massachusetts, pero no se encontró evidencia de la persistencia del parasitoide o de control de la población de garrapatas (Samish y col., 2004). Sin embargo en 1997 Mwangi y colaboradores liberaron alrededor de 150.

000 especímenes de *I. hookeri* en un periodo de un año para el control de *Amblyomma variegatum*, y encontraron una reducción importante en el número de garrapatas, lo cual sugiere que las liberaciones masivas pueden proveer control de garrapatas en sitios particulares (Mwangi y col., 1997).

Dado que posee un gran potencial como medio de control biológico, se requiere investigar a mayor profundidad la biología y condiciones de esta especie de avispa, que al parecer requiere una alta densidad de garrapatas para sobrevivir, por lo que no se cree viable su uso a corto plazo (Samish y col., 2004). Al respecto existen grupos trabajando en las características biológicas de esta especie, que han permitido determinar algunas facetas importantes, como por ejemplo que *I. hookeri* parasita comúnmente ninfas alimentadas y en menor grado ninfas sin alimentar, pero raramente lo hace en larvas o hembras alimentadas (Takasu y Nakamura, 2008). Existen también resultados de ensayos donde se valoró la capacidad de reconocimiento y evaluación visual que lleva a cabo este parasitoide para seleccionar un posible hospedador, así como de olores que atraen a *I. hookeri* y le permiten identificar el mejor individuo a ser parasitado (Demas y col., 2000; Demas y col., 2002). Esta información y el conocimiento generado a través de estas y nuevas observaciones pueden ser importantes para futuras estrategias de liberaciones masivas en posteriores ensayos de campo.

2.8.2.3. Patógenos

El Manual of Biocontrol Agents (anteriormente conocido como The Biopesticide Manual) citaba en el año 2001, 96 microorganismos activos, 33 formulados con bacterias, 36 con hongos y 8 con nematodos entomopatógenos. En su última edición (2009) cita alrededor de 2.000 Agentes de Biocontrol, clasificados en: microorganismos (149), productos naturales (89), macroorganismos (140) y semioquímicos (74). Esto demuestra el interés y los grandes avances que se han logrado en esta área de trabajo. En garrapatas se utilizan los siguientes:

2.8.2.3.1. Nematodos.

Los nematodos entomopatógenos son una herramienta útil para el control biológico de artrópodos. Los nematodos de la familia *Heterorhabditidae* y *Steinernematidae* son parásitos obligados de los insectos, afectando a más de 3000 especies. El hábitat natural más común de estos nematodos es la tierra húmeda. Actualmente se producen comercialmente en cuatro continentes para el control de plagas de insectos en agricultura y silvicultura (Samish y col., 2004).

En algunos ensayos llevados a cabo en garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, en condiciones de laboratorio, se observó que los nematodos penetran por el poro genital. Las dosis requeridas para matar el 50 ó 90% de las garrapatas son comparables a las utilizadas comercialmente en el control de plagas en plantas, pero el tiempo de acción es relativamente más prolongado. Así mismo se observó que seis géneros de garrapatas Ixódidas y dos Argásidas murieron rápidamente al ser expuestas a los nematodos. Aparentemente solo *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, es resistente al ataque de estos patógenos (Mauleon y col., 1993). En condiciones de campo los resultados variaron considerablemente, lo cual puede explicarse debido al tipo de suelo, humedad del mismo y radiación UV. De las nueve cepas que se probaron frente *R. annulatus*, la cepa mexicana *Steinernema carpocapsae* que se comercializa ampliamente, fue la más efectiva (Samish y col., 2004). Actualmente se continúa trabajando en la evaluación bajo condiciones de laboratorio y de campo controladas, de diferentes nematodos y diversas cepas de *Steinernema carpocapsae* (Steinernematidae: Rhabditida) para el control de hembras alimentadas de *Anocentor nitens* (Freitas-Ribeiro y col., 2009). De igual manera se trabaja con cepas de *Heterorhabditis amazonenses* (Rhabditidae: Heterorhabditidae) para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (de Oliveira y col., 2010). Incluso se está evaluando la posible utilización conjunta de algunas cepas de nematodos y acaricidas convencionales para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, demostrándose hasta el momento, una buena sinergia, lo cual ha permitido disminuir las concentraciones de estos últimos, contribuyendo a prevenir el

desarrollo de resistencias (Reis-Menini y col., 2008). Aun cuando existe mucho trabajo por realizar, los nematodos entomopatógenos, se consideran potenciales herramientas útiles para el control de garrapatas, sin embargo, es posible que su uso esté limitado a ciertos nichos ecológicos.

2.8.2.3.2. Bacterias.

Otros patógenos para las garrapatas son las bacterias. Estas son halladas frecuentemente en garrapatas recogidas en estado silvestre y aunque la mayoría no se consideran dañinas para ellas, algunas muestran patogenicidad, por ejemplo *Proteus mirabilis* en *Dermacentor andersoni* y *Cedecea lapagei* en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Esta última penetra por la abertura genital y bajo condiciones de laboratorio produce mortalidades de hasta el 100% (Samish y Rehacek, 1999; Samish y col., 2004).

La bacteria conocida como *Bacillus thuringiensis* (Bt), es el insecticida biológico más difundido a nivel mundial. Es un bacilo Gram positivo, de flagelación peritrica, aerobio estricto, que desarrolla esporas (Sauka y Benintende, 2008). Cada cepa de esta bacteria produce una mezcla diferente de proteínas, denominadas Cry (del inglés Crystal), siendo específica hacia un determinado taxón de insectos. Así, mientras algunos Bt controlan la larva de polilla que afecta a determinadas plantas, otros Bt son específicos de larvas de moscas y mosquitos. La especie de insecto diana, depende de la producción de dicha proteína por un particular tipo de Bt, la cual puede unirse a los receptores intestinales de la larva, ocasionándole muerte. Los productos de *B. thuringiensis* han probado ser los agentes de biocontrol más populares en agricultura e incluso se han producido plantas transgénicas de algodón y maíz con genes que expresan diversas proteínas Cry (Navon, 2000; Sauka y Beninetende, 2008).

Este agente biológico se ha utilizado para el control de mosquitos y otros dípteros, desde hace 30 años, específicamente *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (Bti) que produce tres toxinas Cry, con alta actividad

insecticida hacia larvas de mosquitos transmisores del dengue y malaria (Soberon y Bravo, 2007). Desde su descubrimiento y junto con *Bacillus sphaericus*, son los dos agentes mayormente utilizados en formulaciones no químicas para el control de mosquitos en muchos lugares de Estados Unidos y otros países (Lacey, 2007).

En cuanto a su uso en garrapatas, se puede pensar que debido a su mecanismo de acción y por el tipo de alimentación de las mismas, es poco probable que alguna cepa de Bt penetre y ocasione daño a las garrapatas, sin embargo en ensayos llevados a cabo en condiciones de laboratorio se encontraron tres variedades comerciales de *B. thuringiensis* (*B. t. kurstaki*, *B. t. israelensis* y *B. t. thuringiensis*) que producen mortalidad cuando se aplican en adultos alimentados y sin alimentar de *Argas persicus* o *Hyalomma dromedarii*, siendo *Bt kurstaki* la más patogénica con LC₅₀ 215-439 µg/ml al día 5 para *Argas* y de 1200-2344 µg/ml para *Hyalomma* (Samish y col., 2004). En otra experiencia en condiciones de laboratorio se alimentó artificialmente a *Ornithodoros erraticus* con sangre inoculada con esporas de *Bacillus thuringiensis* obteniendo un 100% de mortalidad. Sin embargo, cuando el ensayo se realizó inyectando esporas en hámster no se observó efecto alguno (Estrada-Peña, comunicación personal a Samish, 2004). Aún queda trabajo por hacer en este campo pero el futuro es prometedor a la luz de los resultados previos.

2.8.2.3.3. Protozoos.

Algunos protozoos también están siendo estudiados como patógenos potenciales de las garrapatas. Tal es el caso de *Nosema ixodis*, *Nosema parkeri* y *Nosema slovaca* las cuales se han encontrado en garrapatas *Ixodes ricinus*, *D. reticulatus* y *D. marginatus*, aunque aparentemente solo *N. slovaca* es patógena (Samish y Rehacek, 1999).

2.8.2.3.4. Hongos entomopatógenos.

Otro grupo importante de patógenos susceptibles de ser usados para el biocontrol de plagas son los hongos entomopatógenos. Los hongos entomopatógenos invaden al artrópodo y penetran la cutícula por medios físicos y químicos y le ocasionan la muerte debido a una combinación de factores como pérdida de nutrientes, obstrucción física, invasión de órganos y toxicosis (Polar y col., 2008).

Estos microorganismos fueron de los primeros en ser utilizados para el control biológico de plagas, por su habilidad para penetrar la cutícula de los artrópodos. Su acción patógena es relativamente específica y son inocuos para los vertebrados (Samish y col., 2004; Reis y col., 2008). En una revisión amplia, por Chandler y colaboradores (2000), se mencionan 58 especies de hongos, ya sea en condiciones de laboratorio como en la naturaleza, que infectan al menos 73 especies de ácaros. De estos, las especies más importantes que infectan garrapatas Ixódidas en condiciones naturales son *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*), *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroses*) y *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) (Fernández y col., 2012).

Metarhizium anisopliae, uno de los hongos más estudiados, no fue aislado de garrapatas (Samish y Rehacek, 1999). Sin embargo, junto con *Beauveria bassiana* son el conjunto de hongos que han mostrado la mayor virulencia y una excepcional habilidad para germinar incluso a humedades relativas bajas (Samish y Rehacek, 1999). Estudios sobre *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* mostraron mortalidades 10-97% (dependiendo de especie y estadio de la garrapata) y disminución de la oviposición en un 48-68% (Kaaya y Hassan, 2000; Maranga y col., 2005; Bahiense y col., 2006 y Reis y col., 2008). Así mismo se observó que en contraste con otras especies, los huevos de garrapata son altamente susceptibles a los hongos y hasta el 100% de los huevos expuestos a hongos en condiciones de laboratorio no eclosionaron (Gindin y col., 2003). Cuando se ensayaron infestaciones conjuntas con ambos hongos, las mortalidades llegaron al 99% en larvas de

R. appendiculatus y *Amblyomma variegatum* (Samish y col., 2004; Fernandes y Bittencourt, 2008).

Otros hongos como *Lecanicillium lecanii* e *Isaria fumosorosea* han mostrado buenos resultados frente a larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Ornithodoros moubata* (Zabalgogezcoa y col., 2008; Ángel-Sahagún y col., 2010).

La principal desventaja de la utilización de hongos entomopatógenos en el control de plagas son su lentitud de actuación, que requieren alta humedad para germinar y su susceptibilidad a la radiación UV, además de que algunas cepas podrían afectar artrópodos no diana (Ginsberg y col., 2002; Rangel y col., 2004).

Debido a los recientes avances en la producción, formulación y tecnología de aplicación los pesticidas biológicos comerciales, formulados con base en hongos: mico-insecticidas y mico-acaricidas, se están volviendo cada vez más populares para el control de plagas en agricultura. Sin embargo la experiencia contra ectoparásitos de animales es limitada. La literatura científica al respecto, demuestra claramente que los hongos entomopatógenos son patógenos para las garrapatas en condiciones de laboratorio. Se han llevado a cabo ensayos con aplicación sobre pastos con resultados prometedores, mientras que las aplicaciones tópicas han arrojado resultados variables (Polar y col., 2008).

Entre los mico-acaricidas que han demostrado su habilidad de matar garrapatas en condiciones de laboratorio, se pueden citar numerosos ensayos publicados al respecto, en donde se han utilizado los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, ya que se ha demostrado que son patógenos para algunas garrapatas duras de la familia Ixodidae, incluyendo *Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus decoloratus*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* y *Amblyomma maculatum* y sin embargo son inocuas para otras como *Dermacentor variabilis* y *Amblyomma americanum* (Kirkland y col., 2005). En condiciones de campo controladas se probó en un área residencial dos mico-insecticidas comerciales a base de *B. bassiana*, registrados para su uso en plagas de plantas ornamentales,

frente a ninfas de *I. scapularis*, observándose una reducción de la población del 59 -89% (Samish y col., 2004).

Debido a los prometedores resultados, las investigaciones actuales se centran en la aplicación de estos hongos en condiciones de campo. Las rutas de aplicación en que se están trabajando son: Aplicación en pastos y aplicación tópica (Polar y col., 2008), aunque ya existen ensayos donde se han administrado conidios por vía oral y tópica en bovinos para combatir la presencia de la mosca del cuerno (*Haematobia irritans*) con buenos resultados (Dinalva y col., 2009).

Así pues, para su utilización en condiciones de campo hay que tener en cuenta que estos hongos son susceptibles a las condiciones ambientales, principalmente radiación solar, humedad y temperatura, lo cual puede afectar su eficacia (Rangel y col., 2004). Se ha visto que el factor ambiental que determina la eficacia de infección de los hongos entomopatógenos es la humedad relativa (Ángel-Sahagún y col., 2010). Usualmente las esporas germinan en humedades relativas altas, si bien existen resultados prometedores en el control de insectos a humedades de 40 a 50% (Ángel-Sahagún y col., 2010). Es posible utilizar ciertos vehículos para aumentar la eficacia, así Ángel-Sahagún y col (2010) lograron infecciones en larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* con *M. anisopliae* a humedad relativa de 32 a 78,6% utilizando como vehículo salvado de trigo.

Por lo tanto, dado que claramente la formulación en que las esporas son aplicadas es crucial, los últimos esfuerzos se han enfocado a desarrollar vehículos protectores, como celulosas polimerizadas en gel o emulsificación, aceites y otros (Samish y col., 2004; Reis y col., 2008), que se utilizan como protectores contra la radiación solar y la desecación. En México se utiliza exitosamente una formulación de citronella para conidios de *M. anisopliae* en el control de la langosta americana (*Schistocerca gregaria*) y en ensayos de campo en aplicación sobre vegetación, el salvado de trigo ha arrojado excelentes resultados (Ángel-Sahagún y col., 2010).

En aplicaciones tópicas sobre animales, también se han observado factores propios del hospedador que afectan el desempeño de los hongos como son: la **temperatura** de la piel, que suele variar de 28 a 40° C, superando el rango ideal para el hongo que es de 20-25 °C. La **humedad** relativa del pelaje del animal que suele ser baja, lo cual interfiere con el desarrollo de los conidios. El **pH** de la piel, que aunque varía en las diferentes zonas anatómicas, se mantiene en un rango de 4,5 a 7,6 en animales adultos, mientras que los hongos requieren medios alcalinos. El **sebo** de la piel también interfiere con el desempeño del hongo, ya que según se ha demostrado, algunos ácidos grasos inhiben la germinación de *M. anisopliae*, y la **microflora** de la piel, que es un conocido mecanismo de defensa y actúa como competencia biológica impidiendo el desarrollo de los hongos (Polar y col., 2008).

Entre los objetivos de investigación tenemos la identificación de aislados tolerantes a altas temperaturas (si bien su rango térmico confiere seguridad biológica a estos hongos), identificar aislados que se desarrollen bien en pH de 4 a 8, y finalmente desarrollar la técnica de la micro encapsulación o tratamientos de pre-lavado de las conidios con sustancias protectoras antes de su aplicación en el ganado (Polar y col., 2008). Todo esto podría ayudar a los hongos a superar las condiciones adversas de la piel. Se espera que el desarrollo de un mico-acaricida altamente efectivo para aplicación tópica en ganado, pudiera sustituir directamente las aplicaciones de acaricidas químicos, pero lo más probable es que sean utilizados como una herramienta para el manejo de resistencias (Polar y col., 2008).

Además de la acción directa inicial en los animales, se busca la acción residual, es decir la garrapata se infecta por contacto con los conidios persistentes en la piel. Se ha visto que esta acción residual está influida por la acción directa inicial, por la persistencia y disponibilidad de conidios (Polar y col., 2008).

2.8.2.3.5. Virus.

En cuanto a la utilización de virus en el control de plagas, existen ya algunos programas de control de plagas agrícolas, como es el caso de polilla del manzano (*Cydia pomonella*), la cual es controlada mediante el virus de la granulosis de la Carpocapsa. Este virus fue aislado por primera vez en poblaciones naturales de Carpocapsa en México, en 1963 (Tanada, 1964). En España se comercializan bajo diferentes nombres, dos de ellos son Madex® (Agrichem) y Calliope actualmente renombrado a Carpovirusina® (Arysta Lifescience) (Miñarro y Dapena, 2000; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente, 2013). De la misma forma que en otras áreas de control biológico, el uso de virus en garrapatas no ha sido evaluado a profundidad. El primer brote de virus en garrapatas fue descrito en una colonia de laboratorio por Sidorov y Scherbakov en 1973, en garrapatas Argásidas *Ornithodoros (Alveonasus) lahorensis*. Este ocasionó erosiones en la cutícula de las garrapatas, probablemente asociadas a desórdenes durante la muda. Así mismo unas partículas semejantes a virus que ocasionan daño a las glándulas salivales y el singanglio han sido observadas, pero la identificación de estas partículas aún no está clara (Megaw, 1978; Rehacek., 1989). Así pues, el conocimiento del efecto de las virosis en garrapatas es aún muy limitado (Samish y Rehacek, 1999).

2.8.3. CONTROL SOBRE ANIMALES

El otro frente de acción en el control de garrapatas es el combate durante su fase parasitaria, es decir cuando se encuentran alimentándose sobre los animales. El establecimiento de estrategias adecuadas es imprescindible para un adecuado control de estas. Actualmente entre dichas estrategias podemos mencionar el uso de vacunas, la selección genética, aplicación de acaricidas y la más reciente, el uso de biopesticidas, de las cuales hablaremos más ampliamente.

2.8.3.1. Vacunas

El control de las infestaciones por garrapatas a través de la vacunación, tiene las ventajas de tener un buen costo-efecto, reducir la contaminación ambiental y prevenir el desarrollo de cepas resistentes a los acaricidas, que resulta de la aplicación excesiva y continuada de estos (Willadsen, 1997; de la Fuente y Kocan, 2006).

El desarrollo de las vacunas se ha dividido en varias etapas las cuales son, demostración de su viabilidad, identificación de antígenos protectores, inducción de respuesta inmune protectora, producción comercial viable de antígenos vacunales y demostración de un buen nivel de impacto en condiciones de campo (Willadsen, 1999). Así pues en los últimos 70 años un gran número de vacunas anti-garrapatas han sido estudiadas utilizando diferentes antígenos e inmunógenos, incluyendo macerados de garrapatas completas, así como extractos de glándulas salivares, intestino y cutícula (Willadsen, 2004).

El control de las enfermedades requiere la aplicación del principio de estabilidad endémica y el desarrollo de vacunas recombinantes mejoradas. Una estrategia prometedora es la identificación de sitios receptores en el intestino de las garrapatas vectores y el desarrollo de anticuerpos que se unen a estos sitios bloqueando que los patógenos ingeridos por la garrapata la infecten. El ganado inyectado con antígenos para este sitio receptor puede producir anticuerpos que las garrapatas ingerirían al alimentarse en ellos (Merck, 2008).

A principios de los años 90 se desarrollaron las primeras vacunas recombinantes que inducían protección de los hospedadores vertebrados contra las infestaciones por garrapatas. Estas vacunas contenían el antígeno de la proteína Bm86 del intestino de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Esta fue purificada del epitelio intestinal de una cepa de garrapatas australianas (Yeerongpilly) por Willadsen y colaboradores en 1989 (Peconick, 2008). A partir de esto, dos vacunas elaboradas con la proteína recombinante Bm86 fueron registradas, una en América (Gavac®) y otra en Australia (Tickgard®). Estas vacunas son producidas por medio de

tecnología recombinante donde la proteína Bm86 se expresa en *Pichia pastoris* (de la Fuente y col., 2007; Peconick., 2008; Canales y col., 2009).

Ha transcurrido más de una década desde la presentación de estas vacunas. En numerosos ensayos de campo se ha demostrado que la vacuna reduce el número de hembras alimentadas, así como su peso y capacidad reproductiva, lo cual significa que el mayor efecto de la vacunación se observa como una reducción en la infestación por larvas en la subsecuente generación. En ensayos de campo controlados llevados a cabo en México, Brasil, Cuba y Colombia se demostró el éxito de estas vacunas para el control de infestaciones con *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (de la Fuente, 2007). Los resultados de campo de esta vacuna que se han descrito, muestran un 56% de reducción en el número de garrapatas en una sola generación en Australia. En Cuba se obtuvo una reducción de dos tercios en el número de tratamientos acaricidas requeridos para mantener el control de garrapatas, así como una reducción de anaplasmosis y babesiosis (Willadsen, 2006). A pesar de lo anterior en algunas regiones los resultados no fueron tan alentadores, debido probablemente al polimorfismo genético de las diferentes poblaciones de garrapatas en diferentes zonas. En algunos casos se observó que las vacunas con Bm86 tenían mayor eficacia protegiendo contra *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* que contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Peconick y col., 2008; Almazán y col., 2010). Esto derivó en el establecimiento de programas de inmunización controlados, donde se observó que las vacunas elaboradas con Bm86 también protegen contra *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* y *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* (Canales y col., 2009; Almazán, 2010).

Desde el desarrollo inicial, los esfuerzos se han centrado en el descubrimiento de nuevos inmunógenos, o la combinación de estos que puedan ser eficaces contra muchas poblaciones de garrapatas simultáneamente. Ejemplos tenemos el de Patarroyo y colaboradores, que en 2002 desarrollaron una vacuna sintética contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SBm 7462) que incluye secuencias de los oligopéptidos 4822, 4823 y 4824, derivados de la proteína Bm86. La eficacia

de estos fue comprobada *in vitro* e *in vivo*, demostrándose que contiene secuencias altamente conservadas correspondientes al antígeno e inmunodeterminantes de la proteína Bm86, la cual probablemente sería eficiente en el control de infestaciones por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de diversos orígenes en cepas de garrapatas de América del Sur (Peconick y col., 2008).

La proteína recombinante Bm86 ha sido expresada en *E. coli*, *Aspergillus nidulans*, *A. Niger* y *Pichia pastoris*, siendo ésta última la que ha mostrado la más eficiente secreción de proteínas. Con base a estos resultados, se llevaron a cabo los ensayos pertinentes con vacunas elaboradas con Ba86, obtenida de la clonación del gen codificante para el Bm86 ortholog de garrapatas de Asia y África *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Bm 86), *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* (Bd 86) y *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Ba 86), la proteína recombinante obtenida fue secretada y purificada de *Pichia pastoris*. La vacunación con esta produjo protección contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Canales y col., 2008; Canales y col., 2009).

Actualmente se están desarrollando vacunas, en las cuales se ha observado una significativa protección contra *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* y *Hyalomma dromedarii*, mientras que se muestra inefectiva contra *Rhipicephalus appendiculatus*. Sin embargo no solo se está trabajando con vacunas para el control de garrapatas, también se están desarrollando vacunas contra *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en Australia y *Theileria annulata* en Israel y China (Willadsen, 2006).

La identificación de antígenos protectores contra garrapatas sigue siendo el factor limitante en el desarrollo de nuevas vacunas. El avance de las técnicas moleculares ha permitido el descubrimiento de numerosas moléculas con potencial inmunogénico que pueden ser útiles en el desarrollo de nuevas vacunas (de la Fuente y Kocan, 2006; Peconick y col., 2008).

Desde 2006 se han encontrado nuevos antígenos, algunos dentro de la categoría de los “antígenos expuestos” como el 64P, que proviene de una

proteína del cemento que permite a la garrapata fijarse a su hospedador. Otros son antígenos escondidos como las clásicas Bm86 y Bm95 que provienen de una proteína intestinal de las garrapatas. Otros antígenos escondidos obtenidos del epitelio intestinal de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* son Bm86, Bm91, Bm95 y BmPRM entre otros (Kumar y col., 2009).

El antígeno Bm95 ha producido buena protección aún contra cepas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistentes a la inmunización con Bm86 y es más universal que el Bm86 protegiendo contra infestaciones por la mencionada garrapata provenientes de diferentes zonas geográficas. Se han elaborado y probado vacunas que combinan ambos tipos de antígenos con excelentes resultados y se les llama vacunas “duales” (Kumar y col., 2009).

Otro tipo de vacunas son las vacunas dirigidas hacia múltiples especies, utilizando la protección cruzada, como es el caso de la vacuna elaborada con el antígeno Bm86, dirigida originalmente hacia el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y que resultó dar protección contra *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* e incluso en menor grado contra *Hyalomma* y *Rhipicephalus* spp (de la Fuente y Kocan, 2006).

Un antígeno muy prometedor es la Subolesina (4D8) una proteína altamente conservada que ha sido identificada en un amplio rango de organismos que van desde nematodos hasta el ser humano. Esta proteína es considerada un buen antígeno candidato para la formulación de vacunas en el control de múltiples especies de garrapatas, así mismo algunos resultados preliminares sugieren que esta proteína puede afectar la transmisión de enfermedades al disminuir la capacidad vectorial de las garrapatas. Otra aproximación es la combinación de antígenos contra garrapatas y antígenos contra enfermedades por ellas transmitidas, tal es el caso de una vacuna elaborada con el antígeno Ra86 (Homologa Bm86 para *Rhipicephalus (Boophilus) appendiculatus*) con el antígeno p67 para *Theileria parva* (de la Fuente y Kocan, 2006).

Un gran número de nuevos antígenos se están estudiando, entre ellos también podemos mencionar los antígenos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SUB (Subolesina) y el UBQ glutathione-S transferasa, ubiquitin) que interfieren con el ARN (ARNi) en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. Los resultados con las vacunas elaboradas con SUB alientan posteriores investigaciones en el uso de la subolesina sola o en combinación con otros antígenos (Almazán y col., 2010).

Entre los nuevos antígenos, se encuentra la enzima nucleotidasa 5', la cual se localiza principalmente en los túbulos de Malpighi de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Así, una vacuna recombinante elaborada con este antígeno fue probada y arrojó excelentes resultados en ovejas, sin embargo no tuvo efecto en ganado vacuno. Aún se cree que puede utilizarse en combinación con los antígenos ya conocidos para mejorar la eficacia de estos últimos (Hope y col., 2010).

El trabajo en el desarrollo de nuevas vacunas continúa. Existen numerosos ejemplos al respecto tal como los progresos alcanzados en la identificación de antígenos para el desarrollo de una vacuna contra *Hyalomma annatolicum* en India, principal plaga del ganado de esta región (Ghosh y col., 2008).

La genómica es un herramienta sumamente útil y actualmente se están llevando a cabo ensayos por medio de ARNi (es una molécula que suprime la expresión de genes específicos por interferencia), para identificar antígenos (de la Fuente y col., 2007) Entre los genes investigados se incluyen GTS (Glutathione-S transferasa), UBQ (ubiquitin), SEL (Selenoproteína W), EF-1a (Factor de elongación 1 alfa) y SUB (subolesina) (Almazán y col., 2010).

Así pues, los mayores componentes para el desarrollo de nuevas vacunas son además del descubrimiento de nuevos antígenos, las pruebas de campo, la apropiada formulación y uso de adyuvantes y comercialización (de la Fuente y Kocan, 2006).

En el campo de los adyuvantes también se han identificado nuevos candidatos tal como la saponina que ha sido evaluada como segura, dado que los adyuvantes comunes han ocasionado problemas como inflamación crónica y problemas autoinmunes (Ghosh y col., 2008).

2.8.3.2. Selección genética

Primero abordaremos los aspectos más relevantes de la resistencia genética de algunas razas de ganado vacuno y sus aplicaciones prácticas.

Es de sobra conocido que las raza de ganado Cebú (*Bos indicus*) y Sanga (mezcla de *Bos taurus* y *Bos indicus*), razas nativas de Asia y África, son altamente resistentes a las garrapatas Ixódidas después de una exposición inicial. En cambio las razas europeas (*Bos taurus*), permanecen susceptibles. Así pues, con este conocimiento, se ha incrementado el uso de la resistencia natural de las razas cebuinas y sus cruces, como método de control para las fases parásitas de las garrapatas. La introducción de ganado cebuino ha revolucionado el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y ha cobrado importancia en África, Australia y América (Merck, 2008).

Los avances en ingeniería genética han producido exitosamente animales transgénicos como cerdos, ovejas, conejos y ganado vacuno, sin embargo es imperativa la identificación y completa caracterización de los genes de resistencia a las garrapatas de las razas tropicales de ganado vacuno antes de la experimentación en la producción de ganado transgénico con resistencia a las garrapatas (Ghosh y col., 2007).

2.8.3.3. Acaricidas

A pesar de todo lo expuesto previamente, el método más utilizado de control de garrapatas sigue siendo el uso de ectoparasiticidas químicos. Estos pueden aplicarse a las fases libres en el medio ambiente o a las fases parasitarias en los hospedadores.

En los animales estos productos se pueden administrar por vía parenteral o tópica. En años recientes se han desarrollado diferentes métodos de aplicación de acaricidas, incluyendo sistemas de liberación prolongada, implantes sistémicos y bolos sistémico que permiten una lenta liberación de los acaricidas convencionales, como los implantes para orejas, pour-on y spot-on.

Entre las administraciones tópicas, los productos aplicados en polvo fueron ampliamente utilizados, pero han sido sustituidos por otros métodos de aplicación, debido principalmente a que es difícil aplicar la dosis exacta para cada animal y también por su corta acción residual, lo que hace necesario aplicaciones frecuentes. Los baños por inmersión son otro método, pueden ser de cuerpo completo o bien, poco profundos de manera que se impregnan solo las patas y vientre de los animales tratados. Tienen la desventaja que es necesaria la continua supervisión de la concentración del producto. Otros métodos ampliamente utilizados de administración tópica son la aplicación por aspersión de emulsiones acuosas directamente al animal.

En algunos casos, en los que resulta difícil reunir al ganado para aplicarles los tratamientos o bien para la fauna silvestre, se utilizan bolsas u otros artefactos impregnados con el acaricida y se colocan en los “rascaderos” de manera que los animales al frotarse contra ellos, se impregnan del acaricida (Polar y col., 2008; George y col., 2008b).

La mayoría de los ectoparasiticidas son neurotoxinas que ejercen su efecto en el sistema nervioso de los parásitos. Aquellos utilizados en el ganado doméstico se pueden clasificar de acuerdo a su estructura y mecanismo de acción en: carbamatos, piretrinas y piretroides; avermectinas y milbemicinas; organoclorados, organofosforados, furamidinas, reguladores del crecimiento y compuestos misceláneos, que son una mezcla de dos o más de los productos mencionados. También existen algunos repelentes como el MGK-264, butoxypolypropilen-glicol y el DEET (George y col., 2008b).

Históricamente el uso de acaricidas ha sido clave en la ganadería. Encontramos que hasta mediados del siglo veinte, los acaricidas mayormente utilizados para el control de garrapatas eran derivados del arsénico, los cuales tenían poca eficacia y efectos residuales severos, además de ser altamente tóxicos para el ganado (Polar y col., 2008). Los primeros remedios utilizados en los Estados Unidos consistían en frotar las patas y costados del ganado con una mezcla de grasa y azufre, queroseno o aceite de algodón. En Australia un grupo de investigadores sumergían el ganado en baños de inmersión que contenían aceite mineral. En 1910, la Oficina de la Industria Animal en Estados Unidos, adoptó los baños de arsénico por inmersión como método recomendado para el control de garrapatas (George y col., 2008). Así pues, durante la década de los 60's el método clásico de eliminar las garrapatas en los animales era mediante baños o pulverizaciones con soluciones de arsenito sódico al 0,2%, aplicadas semanalmente. Otros métodos utilizados fueron, espolvoreos y baños con lindano (HCH), muy eficaces contra *Amblyomma americanum*, *Amblyomma maculatum* y *Dermacentor albipictus*. En América, se utilizaban de preferencia HCH, DDT (Diclorodifeniltricloroetano), aldrín, dieldrín, clordano y toxafeno (Gill-Collado, 1961; Polar y col., 2008).

Algunas garrapatas como las especies de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* desarrollaron resistencia al arsénico en 1935. Esto obligó a elevar las dosis, estrechando el margen de seguridad entre la concentración mínima efectiva y los efectos tóxicos en el ganado. Aumentado esto, la preocupación sobre la acumulación de residuos tóxicos en los tejidos animales (Polar y col., 2008; George y col., 2008b).

Con el tiempo un rango de acaricidas incluyendo organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas y piretroides fueron desarrollados para el control de garrapatas (Polar y col., 2008).

A mediados de la década de 1940 estuvieron disponibles los primeros productos organoclorados. Los primeros en ser utilizados como acaricidas fueron el DDT y el BHC (benzenohexaclorido). Todos los pesticidas

organoclorados persisten en el ambiente y tienden a acumularse en la grasa corporal. Estas características y en menor medida, el hecho de que *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* y *Rhipicephalus (Boophilus) appendiculatus* desarrollaran resistencia, provocó que se retiraran del mercado y fueran reemplazados por los pesticidas organofosforados. Dentro de este grupo de pesticidas los más utilizados fueron: etión, clorpirifós, clorfenvinfos y coumafós. Desafortunadamente el uso de estos pesticidas fue limitado por la resistencia cruzada con los organoclorados. Los piretroides fueron descubiertos en 1949. Los primeros derivados de estos en ser utilizados para el control de garrapatas fueron la permetrina y el fenvalerato, sin embargo, posteriormente se demostró compartían resistencia cruzada con el DDT, lo que provocó que su uso se limitara en algunos países y llevó al desarrollo de la siguiente generación de piretroides sintéticos, como: cipermetrina, deltametrina y cialotrina. Estos acaricidas siguen siendo efectivos en la actualidad junto con las foramidinas, clordimeform, clenpirin, clorometiuron y amitraz, todos ellos miembros de un pequeño grupo de químicos que aún son efectivos contra las garrapatas. El descubrimiento de las lactonas macrocíclicas supuso una revolución en el control antiparasitario, si bien su utilidad frente a garrapatas fue más discreta. Entre ellas destacan las avermectinas, que son derivados del actinomiceto *Streptomyces avermitilis* y las milbemicinas que son derivados de la fermentación de *S. hygroscopicus aureolacrimosus*. Así, la ivermectina, eprinomectina y doramectina están relacionadas a las avermectinas. La moxidectina es la única relacionada a la milbemicina. Todos se comercializan para el control de garrapatas. Otros compuestos eficaces son el fipronil, un compuesto del fenilpirazol, que se aplica como pour-on y el fluazurón una benzoil fenil urea, que inhibe la formación de quitina en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, cuyo efecto principal en las garrapatas es la reducción de la fertilidad en las hembras repletas y aumento de la mortalidad de los estadios inmaduros, dado que no consiguen finalizar la muda. Además el fluazurón se elimina en la leche, por lo cual protege también a los becerros lactantes, pero hay que tener en cuenta que el

periodo de supresión antes del sacrificio en animales para el consumo humano debe ser de por lo menos seis semanas (George y col., 2008a).

Aun cuando el amitraz se considera un acaricida efectivo, es necesario mencionar que existen cepas de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que ya han desarrollado resistencia a este producto. El amitraz fue introducido en Australia en 1975 y el primer caso de resistencia fue conocido en 1980. La cepa resistente a amitraz fue designada Ulam por el nombre de la comarca donde fue identificada. En 1992 se encontraron garrapatas en una propiedad productora de carne, que expresaban resistencia al amitraz y a todos los acaricidas piretroides sintéticos, a esta cepa se le nombró Ultimo. En México la resistencia al amitraz no fue identificada hasta el año 2001, 15 años después de su introducción en 1986. Sobre este mismo tópico, la resistencia a los piretroides emergió por primera vez en Australia en 1984 (Jonsson y Hope, 2007).

Desde la primera cita de resistencia a los acaricidas por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* hacia el arsénico en Australia en 1935, la progresiva evolución de resistencia de las garrapatas que afectan al ganado a casi todos los acaricidas disponibles, ha frustrado los esfuerzos de los productores para manejar las infestaciones y las enfermedades transmitidas por ellas. Como era de esperarse el espectro de resistencia a los acaricidas continúa creciendo, el amplio uso de lactonas macrocíclicas para el control de parásitos y las limitadas opciones de acaricidas alternativos, ocasiona la preocupación que la resistencia a las lactonas macrocíclicas se convertirá en un problema mayor en un futuro próximo. (Jonsson y Hope, 2007, George y col., 2008b).

Después de lo anteriormente citado se puede concluir que las garrapatas desarrollan resistencia a los acaricidas químicos después de un tiempo de exposición, lo que constituye una gran preocupación para la industria ganadera. El amitraz y las resistencias que produce es el acaricida más estudiado, permitiendo establecer algunas de las posibles causas. Actualmente se estudian los genes involucrados en la herencia de la resistencia al amitraz en las garrapatas. Se sabe que es una característica

recesiva y con fuerte herencia materna, que es poligenética y por lo tanto más probable que se desarrolle lentamente (Jonsson y Hope, 2007).

También se ha determinado que existe una relación positiva entre la resistencia y frecuencia de aplicación de acaricidas (Jonsson y Hope, 2007), por lo tanto se ha llegado a la conclusión de que el método más efectivo para disminuir la velocidad de desarrollo de resistencia a los acaricidas, es reducir el número de tratamientos al mínimo (George y col., citado por Polar y col., 2008).

Además de los problemas de resistencia, se sabe que los acaricidas químicos son tóxicos, contaminan el ambiente y dejan residuos en la carne y leche, lo cual es una preocupación creciente para los consumidores, sin embargo, a pesar de su elevado coste, su relación beneficio-coste es buena, pero su uso incorrecto ha limitado su eficacia y por lo tanto su uso se ha vuelto problemático (Jongejan y Uilenberg, 2004; Willadsen, 2006).

Así pues, los principales inconvenientes incluyen también, tiempos de espera de los productos, persistencia ambiental indeseable y alta toxicidad para los mamíferos.

La evolución de la resistencia a la mayoría de los acaricidas químicos disponibles en el mercado utilizados para el control de garrapatas y el desarrollo de apenas unos pocos productos nuevos crea un horizonte oscuro para el futuro de los acaricidas químicos (George y col., 2008b).

En este sentido, la mayoría de los estudios sobre resistencia a acaricidas químicos se han desarrollado en la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, debido a su importancia económica. Esta garrapata es la principal plaga en ganado bovino doméstico, afectando seriamente a la industria de producción de carne y leche. La importancia económica de esta garrapata es indiscutible, y es por eso que se siguen desarrollando productos químicos para su control. Sin embargo se estima que el coste de desarrollar un nuevo producto es alrededor de 100 millones de dólares, el cual tendrá una vida útil de aproximadamente 10 años. Esto sin mencionar la cantidad de tiempo que consumen las investigaciones al respecto. Es por

esto que en los últimos años sólo se han introducido unos pocos productos nuevos con un mecanismo de acción diferente. Los mayores avances se han hecho en reguladores del crecimiento, especialmente en animales de compañía (de la Fuente y col., 200; Kiss y col., 2012).

Todo esto está empujando a la ciencia a investigar nuevas aproximaciones al manejo de plagas. Uno de estas aproximaciones concentra sus esfuerzos en el empleo de derivados de plantas con efecto repelente o tóxico para su control. De manera que se han establecido nuevas líneas de investigación, buscando alternativas ecológicas, que no dañen el medio ambiente y que constituyan una alternativa eficaz para las cepas resistentes a acaricidas convencionales. Así se ha llegado al desarrollo de los biopesticidas, vacunas, selección genética y estrategias de control biológico.

2.9. BIOPESTICIDAS

Los biopesticidas son productos derivados de materiales naturales como animales, plantas, bacterias y ciertos minerales, como el aceite de canola y el bicarbonato de sodio. Incluyen sustancias que existen en la naturaleza (pesticidas bioquímicos) y sustancias pesticidas producidas por plantas que poseen material genético añadido (Plant-Incorporated-Protectants o PIP's). A finales del año 2001 había registrados aproximadamente 195 sustancias activas biopesticidas con las cuales se elaboran y 780 productos comerciales y la cifra continúa aumentando vertiginosamente, ya para el año 2009 se tenían 2,000 productos comerciales en el manual de agentes de biocontrol (The Manual of Biocontrol Agents), editado por The British Crop Protection Council.

Las ventajas de utilizar biopesticidas incluyen que son menos tóxicos que los pesticidas convencionales y que generalmente solo afectan a la especie diana y organismos muy cercanamente relacionados a esta. En contraste los pesticidas convencionales de amplio espectro, pueden afectar organismos tan diferentes como aves, insectos y mamíferos.

Los biopesticidas son por lo general efectivos en muy pequeñas cantidades y por lo común se descomponen rápidamente, lo cual resulta en bajas exposiciones evitando en gran parte los problemas de contaminación causados por los pesticidas convencionales.

La idea de utilizar agentes biológicos para el control de garrapatas es muy atractiva, sin embargo las dificultades prácticas de llevar esto a cabo no han sido resueltas. El amplio rango de agentes patógenos o depredadores para las garrapatas ha sido bien revisado y continúan las pruebas en condiciones de laboratorio con variados agentes capaces de matar garrapatas. Un buen ejemplo de esto son los esfuerzos que se han centrado en un par de agentes fúngicos, *Beauveria* y *Metarhizium*. Aun cuando los resultados en condiciones de laboratorio son excelentes, existen problemas para la aplicación en condiciones de campo que aún deben resolverse, como la manufactura, distribución y la estabilidad de tales agentes vivos en condiciones de campo o sobre el ganado (Willadsen, 2006). Aun así los agentes de control biológico más prometedores para garrapatas, son los hongos entomopatógenos, particularmente los mencionados *Beauveria* y *Metarhizium spp.* También los nematodos de la familia *Steinernatidea* y *Heterorhabditidae* y las aves como el picador del buey (Polar y col., 2008)

Los biopesticidas se clasifican en tres grandes grupos o clases:

1. - Biopesticidas microbianos
2. - Biopesticidas bioquímicos
3. - Productos Derivados de Plantas (PDP).

2.9.1. BIOPESTICIDAS MICROBIANOS.

Consistentes en microorganismos (bacterias, hongos, virus o protozoarios) que son patógenos para los organismos diana. Los biopesticidas microbianos pueden controlar muchos tipos diferentes de plagas, sin embargo cada sustancia activa por si sola es relativamente específica para su plaga. Por ejemplo, hay hongos que controlan ciertas malezas, mientras que otros hongos matan ciertos insectos específicos. Un excelente ejemplo

de este tipo de biopesticidas son los hongos entomopatógenos ya analizados en el apartado de control biológico.

Así mismo, otros biopesticidas microbianos extensamente utilizados son sub-especies y cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), de las que también ya se mencionaron sus características.

2.9.2. BIOPESTICIDAS BIOQUÍMICOS

Son sustancias que ocurren naturalmente y que controlan plagas por medio de mecanismos no tóxicos. Los pesticidas convencionales por lo contrario generalmente son materiales sintéticos que directamente matan o inactivan la plaga. Los pesticidas bioquímicos incluyen sustancias como las feromonas de insectos, que interfieren con el apareamiento de los insectos, así como algunos extractos de plantas que atraen a los insectos hacia trampas.

A continuación repasamos algunos de los que tienen actividad ixodocida reconocida.

El **ácido oxálico (AO)**, es un ácido orgánico dicarboxílico fuerte. Es constituyente de las plantas donde se encuentra involucrado en la germinación de semillas, almacenaje y regulación de calcio, balance de iones, detoxificación, fuerza estructural y repelencia de insectos. Es también un metabolito de algunos hongos. En los mamíferos el AO es producto final de metabolismo de aminoácidos, se excreta con la orina y las heces. Se considera una sustancia ubicua en los tejidos de mamíferos y plantas, también es constituyente del humo. En la industria y sector doméstico se utiliza como limpiador, blanqueador y auxiliar de colorantes, también es utilizado para el control de *Varroa destructor* en colonias de abejas melíferas (EMEA/MRL, 2003; EPA, 1992).

El AO se considera un factor de virulencia de los hongos fitopatógenos y entomopatógenos, ya que al parecer facilita la disrupción de la pared celular de las plantas, mientras promueve las funciones de las enzimas líticas

fungales (Su mecanismo de acción en insectos ya se mencionó previamente, en el capítulo dedicado a los hongos entomopatógenos). Ha sido identificado en cadáveres de insectos infectados por hongos como *B. bassiana* (Cessna y col., 2000).

En la década de los 80's en Europa del Este y Asia, se dio un auge en el estudio de su efecto acaricida frente al ácaro *Varroa destructor*, ensayándose diferentes vías de aplicación, como la sublimación, goteo y aspersión. Se demostró que posee baja toxicidad aguda para las abejas melíferas y una alta toxicidad aguda para los ácaros. Fue aprobado como tratamiento contra la varroosis en abejas melíferas por la EMEA en el año 2003. Actualmente su uso se ha dispersado a través de toda Europa, constituyendo uno de los tratamientos ecológicos más comunes para el control de la varroosis en las abejas (Nanetti y col., 2003, Aliano, 2008, Aliano y Ellis, 2009). Debido a los estudios llevados a cabo por diversos investigadores, el AO se recomienda por diversas organizaciones de apicultores para el tratamiento de la varroosis durante el otoño-invierno, con excelentes resultados (Nanetti y col., 2003, Gregor y Planic, 2004; Apiservices, 2013).

Durante algunos ensayos con hongos entomopatógenos frente a diversas especies de garrapatas, Kirkland y col., 2004, observaron que el sobrenadante de los cultivos parecía tener efecto acaricida en algunas garrapatas que no mostraban suceptibilidad a los hongos. Posteriormente demostraron que el ácido oxálico es uno de los principales factores de virulencia de *Beauveria bassiana*, el cual es dependiente del pH. Este grupo de investigadores fueron pioneros en la pruebas del AO frente a garrapatas, en el año 2005, realizando ensayos con especímenes adultos de *A. americanum* demostraron el efecto acaricida del AO en garrapatas. Aunque ya se conocía el AO para el control de varroosis en abejas melíferas, no existían hasta el momento estudios en garrapatas.

Hasta la fecha, aún hay pocos antecedentes, sin embargo, Olmeda y colaboradores (2008) retomaron esta línea de investigación y publicaron los

efectos *in vitro* del AO en garrapatas *H. lusitanicum*, así mismo establecieron la LD₅₀ en esta especie de garrapatas.

Las feromonas, también son consideradas biopesticidas semioquímicos. Los recientes avances en esta materia han permitido desarrollar nuevas estrategias que reducen el uso de acaricidas químicos convencionales al combinar ambos productos. Los primeros intentos del uso de feromonas para el control de garrapatas datan de 1974, cuando Gladney y colaboradores combinaron la feromona de agregación-fijación de *Amblyomma maculatum* con un acaricida y los depositaron en la piel de bovinos. Las hembras fueron atraídas al sitio y murieron por efecto del acaricida (Sonenshine, 2008). Desde entonces se han logrado avances significativos en el uso de feromonas para el control de garrapatas. Existen algunos aparatos patentados para su uso en vegetación (Last Call ® IPM) que utilizan feromonas atrayentes y acaricidas logrando una mortalidad de 95% en *I. scapularis*. En animales se han utilizado exitosamente señuelos impregnados con feromonas y acaricidas adheridos al pelo de los animales, así como etiquetas en la cola del ganado bovino los cuales han demostrado su eficacia por periodos hasta de tres meses (Sonenshine, 2008). Se continúa investigando en esta área de trabajo debido a los resultados alentadores y se cree que pronto se comercializarán algunos de los aparatos antes mencionados.

Un nuevo producto se está evaluando como agente de control biológico para garrapatas, el espinosad, el cual representa una nueva clase de pesticidas, las espinosinas. El espinosad es el insecticida-acaricida producido a partir de los metabolitos de la fermentación del actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* y es una mezcla de dos componentes: espinosina A y D (Mayes y col., 2003, Davey y col., 2001). Su mecanismo de acción único, incluye la disrupción de la unión de acetilcolina en los receptores nicotínicos en las células post sinápticas. Adicionalmente los factores de espinosina han demostrado efectos secundarios en los receptores GABA, de manera que cuando la espinosina se une a estos receptores el resultado es una hiperexcitación y disrupción del sistema nervioso del insecto (Mayes y col., 2003; George y col., 2008a; Snyder y

col., 2009). Este producto fue desarrollado originalmente por laboratorios Dow Elanco (Lilly) para su uso en sistemas de producción agrícolas. En estudios de campo se demostró su acción contra Dípteros, Thysanopteros, Coleópteros e Himenópteros, debido a su efecto en los últimos la EPA requirió etiquetas advirtiendo su toxicidad en abejas, esto condujo a una serie de ensayos de laboratorio y campo que permitieron determinar que dicha toxicidad solo se presenta cuando el espinosad se aplica directamente sobre las abejas, lo cual permitió modificar las etiquetas posteriormente. Así mismo el espinosad no es tóxico para la mayoría de los insectos beneficiosos, ni para mamíferos (Davey y col., 2001, Mayes y col., 2003).

El espinosad posee atributos que lo convierten en un buen agente de control biológico, como su rápida degradación en el suelo, la cual se atribuye a fotólisis y al metabolismo propio de las plantas y de las bacterias presentes en el suelo. Otros atributos son baja resistencia cruzada con otros acaricidas químicos y baja reducción de la exposición de los trabajadores agrícolas (Mayes y col., 2003). Por esta razón no es de extrañar que se hayan desarrollado fármacos para ganadería y salud humana.

Fue aprobado para su uso en plagas del algodón, como insecticida de bajo riesgo en Estados Unidos en el año 1997 y se comercializa bajo diferentes nombres, la mayoría de las fórmulas consisten en soluciones concentradas, pero también existen presentaciones granuladas para disolver en agua (Mayes y col., 2003).

Su uso se popularizó rápidamente en agricultura como alternativa a otro tipo de insecticidas, debido a su eficacia, amplio espectro, novedoso mecanismo de acción, perfil ambiental y toxicológico favorable y viabilidad para uso en programas de control integrado de plagas.

En ensayos previos se observó que aun cuando el espinosad tiene buena actividad por contacto, es más tóxico cuando se ingiere, para los artrópodos. Así mismo cuando se aplica por aspersión es más efectivo contra los estadio inmaduros (Davey y col., 2001).

En la industria de salud animal, el espinosad también está siendo estudiado y ya existen algunos ensayos al respecto.

En animales de compañía el espinosad ha demostrado su potencial como tratamiento oral para la eliminación y prevención de la infestación por pulgas en perros, donde ha demostrado un efecto rápido y también efecto residual de un mes frente *Ctenocephalides* spp. Siendo comercializado en Estados Unidos bajo el nombre comercial Confortis ®. En un estudio piloto llevado a cabo en perros, la administración oral de una sola dosis de espinosad demostró alta eficacia en el tratamiento de infestaciones con *Rhipicephalus sanguineus*, ocasionando su desprendimiento dentro de las primeras 24 horas y un posible efecto residual de hasta un mes (Snyder y col., 2009). Una nota interesante en este apartado es el boletín emitido por la FDA previniendo la aplicación de dosis altas de Ivermectina simultaneas al tratamiento con espinosad en perros, ya que se han observado casos de intoxicación severa con presentación de signos clínicos correspondientes a los de intoxicación por Ivermectina (FDA, 2008).

En ganado bovino, se ha observado que el espinosad administrado por vía oral, confiere un 90% de control sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos infestados con los tres estadios. Su eficacia es mayor en larvas y ninfas que en adultos. Cuando los tratamientos se aplicaron por aspersión, en las hembras que sobrevivieron el peso medio fue similar en los grupos tratado y control, sin embargo el peso medio de masa total de huevos ovipositados, fue significativamente menor en las hembras tratadas con espinosad. Así mismo se observó un efecto residual que protege contra reinfestaciones por larvas al menos durante 2 semanas. Su mecanismo de acción lo cualifica como un acaricida alternativo para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistente a otros químicos (Davey y col., 2001; George y col., 2008). Al respecto existe un ensayo donde se utilizó espinosad en garrapatas resistentes a amitraz, observándose que al aplicarlos alternadamente en periodos de dos meses, la susceptibilidad a espinosad fue siempre alta y la resistencia a amitraz disminuyó casi hasta desaparecer (Jonsson y col., 2010).

Tanto ensayos de laboratorio, como en campo, al comparar la eficacia del espinosad contra una serie de acaricidas químicos convencionales como son alfa-cipermetrina, clorpirifós, esbiotrina, deltametrina, permetrina y tetrametrina, en larvas de garrapatas *Rhipicephalus turanicus* y *Argas persicus*, se demostró que espinosad tiene igual eficacia que los tratamientos antes mencionados y por lo tanto puede ser una alternativa eficaz a estos (Cetin y col., 2009, Brito y col., 2011).

En España se comercializa y utiliza como insecticida en el control de plagas de diversas cosechas tales como: tomate, pepino y pimientos. También en manzanos y parras entre otros. Se recomienda como alternativa a los pesticidas tradicionales y como agente de control en los programas de control integrado de plagas.

La EMEA autorizó su comercialización para el control de pulgas en perros, administrado en tabletas masticables por vía oral en diciembre de 2010. Bajo el nombre comercial de Confortis Elanco, donde se menciona un efecto residual 4 semanas (EMEA, 2010)

En los animales de producción, su uso está aprobado para el control de ácaros de las gallinas *Dermanyssus gallinae*, recomendándose su aplicación en superficies, nunca directamente en las aves o huevo. Su efecto residual es de hasta 12 semanas y es comercializado bajo el nombre de Elector© por Laboratorios Elanco.

Este producto ha ganado notoriedad por sus características y aun cuando hay pocos estudios sobre su efecto en garrapatas, se esperan excelentes resultados sobre estas, dado su efecto probado en ácaros.

Dentro de este mismo grupo de productos nuevos, el BioUB ® (Homs, LL, Clayton), es un nuevo repelente recientemente registrado en el año 2007 por la EPA (Environmental Protection Agency). Su ingrediente activo es el 2-undecanone, derivado del tomate silvestre (*Lycopersicon hirsutum* Dunal), y aun cuando se ha registrado como repelente de mosquitos, se está valorando su acción repelente frente a garrapatas. Se cree que este repelente puede ser una alternativa viable al DEET, el cual es el estándar

de referencia para este tipo de sustancias, ya que a pesar de su eficacia al aplicarse en la ropa, este no puede aplicarse directamente sobre la piel, debido a las reacciones adversas que produce y el olor y sensación desagradable. Así mismo aún aplicado en la ropa, algunas personas prefieren no utilizar DEET debido a la preocupación por los efectos adversos para la salud tanto en adultos como en niños. Esto ha llevado a los repelentes botánicos a ganar popularidad en los últimos años. Aunque existe un número importante de este tipo de productos en el mercado, por lo general son menos eficientes y su efecto repelente dura menos que el DEET. El BioUD® ha sido comparado con el DEET por su efecto repelente en mosquitos, observándose la misma eficacia en ambos productos y en algunos ensayos, incluso el BioUD® tuvo mejor eficacia después de 6 horas en pruebas de campo en humanos.

Con resultados tan alentadores el siguiente paso fue probar la repelencia de este nuevo producto contra garrapatas, debido a que ya se conoce el efecto repelente del DEET contra *A. americanum* y *D. variabilis* (Salafsky y col., 2000). El primer ensayo se llevó a cabo utilizando garrapatas *D. variabilis* (Garrapata americana del perro), donde se observó en ensayos de laboratorio que BioUD fue más repelente que DEET en pruebas *in vitro*. En aplicación en piel se observó un eficiente efecto repelente durante dos horas y media, y al aplicarse en tela de algodón la eficacia fue igual para ambos productos (Witting-Bissinger y col., 2008). Posteriormente con base a estos resultados se llevaron a cabo ensayos con tres diferentes géneros de garrapatas: *A. americanum*, *D. variabilis* e *Ixodes scapularis* en condiciones de laboratorio, donde se observó la misma eficacia repelente entre DEET y BioUD® en *D. variabilis*, y un mejor desempeño de este último para repeler *A. americanum* e *I. scapularis*. Esto convierte el BioUD® en una eficaz alternativa como repelente de garrapatas (Bissinger y col., 2009).

Así pues en el contexto de la búsqueda de productos con una durable acción antiparasitaria y fuerte potencial de seguridad para los mamíferos y medio ambiente, así como para mitigar el desarrollo de resistencias, la identificación de nuevos agentes antiparasitarios continúa. Ejemplos hay muchos y se pueden citar el caso de la N-teri-Butyl Nodulisporamida (NsA

A), también denominada como ácido nodulisporico A, producto del metabolismo del hongo endofítico *Nodulisporium* sp. Este agente es un candidato aceptable para el control de artrópodos y se está evaluado como ectoparasiticida para el control en animales de compañía para ser administrado oralmente una vez al mes, como medio de control de pulgas y garrapatas, aunque para estas últimas su efecto protector solo permanece durante dos semanas para *D. variabilis* (Meike y col., 2009).

2.9.3. PRODUCTOS DERIVADOS DE PLANTAS (PDP)

Estos biopesticidas tienen varias ventajas sobre el uso de sus equivalentes sintéticos. Generalmente estos productos demuestran baja toxicidad para los mamíferos, generalmente no persisten en el ambiente y por lo tanto se consideran una opción respetuosa con el ambiente en el control de plagas.

Algunos ejemplos del uso de PDP en animales domésticos incluyen, extractos acuosos de flores de manzanilla al 10%, que han arrojado mortalidades de 100% para *Psoroptes cuniculi* Delafond, el ácaro responsable de la otoacarosis en animales domésticos (George y col., 2008a). Así mismo el timol y el eugenol contenidos en el tomillo y clavo de olor arrojaron 100% de mortalidad de estos ácaros vía tópica o por inhalación. En un estudio en perros y gatos un gel fitoaromático fue efectivo controlando *Otodectes cynotis*, ácaro de las orejas y *Sarcoptes scabiei var canis*, causante de la sarna. El limonelo forma la base de varios compuestos comerciales disponibles para el tratamiento de pulgas y garrapatas (David y col., 2008).

En apicultura el timol y sus mezclas se ha recomendado repetidamente para el control de diferentes especies de ácaros, incluidos *Varroa jacobsoni*, *Varroa destructor* y *Acarapis woodi* (Espinosa-Montaña y Guzmán-Novoa, 2006). Sin embargo se debe tener cuidado al emplear PDPs para el manejo de plagas en apicultura, y es altamente recomendable utilizar las dosis aprobadas, debido a que en exceso puede producir efectos negativos para las abejas.

El uso de PDPs en las plagas de ganado también ha sido documentado. Por ejemplo en cerdos, para el control del ácaro de la sarna *Sarcoptes scabiei* se han utilizado aceites volátiles de citronella (arbusto de la familia *Cardiophyllaceae*) y árbol de tea (*Melaleuca alternifolia*), observándose que después de dos aplicaciones de ambas preparaciones se redujo la infestación de ácaros a niveles menores del 5%. Así mismo la garrapata *Rhipicephalus appendiculatus* fue repelida por el aceite esencial del *Gynandropsis gynandra* L (un tipo de arbusto africano) con igual eficacia que el repelente comercial para artrópodos DEET. Trabajando con la misma especie, se encontró que el aceite esencial de *Cleome monophylla* L. un arbusto perteneciente a la misma familia que *G. gynandra* mostró la misma repelencia que el DEET. En Suecia, los investigadores observaron que diluciones de con aceite de *Rhododendron* exhibieron más del 95% de repelencia contra *Ixodes ricinus*, una garrapata de gran importancia en salud humana y animal. En pequeños rumiantes se llevó a cabo un trabajo donde se demostró una mortalidad cercana al 70% en Ixódidos utilizando un extracto metanólico de corteza de árbol de Neem (Ghosh y col., 2007; David y col., 2008, George y col., 2008).

EL uso de PDPs en ectoparásitos de pollos de engorde ha sido documentado también. En un ensayo llevado a cabo en Corea se revisó el efecto acaricida contra *D. gallinae* de 56 aceites esenciales derivados de plantas, entre ellas algunas arrojaron una mortalidad de 100%, como laurel, enebro, clavo, cilantro, rábano, lima, mostaza, pimienta, y tomillo. El aceite de neem también ha sido probado contra *D. gallinae*, con un 92% de reducción en el número de ácaros en las naves. El aceite y extractos de ajo ya se encuentran disponibles comercialmente en algunos países, estos productos se recomiendan para su uso contra *D. gallinae* (George y col., 2008a).

Profundizando en el neem, se trata de un árbol (*Azadirachta indica* Juss), el cual sintetiza un amplio rango de compuestos, incluyendo cierta cantidad de limonoides (tetranortriterpenoides) denominados globalmente como “azadiractina” (AZA) que son letales para una gran variedad de artrópodos (Ghosh y col., 2007; Landau y col., 2009).

El árbol de neem es un miembro de la familia *Meliaceae*. Crece en las áreas tropicales de Asia, particularmente en India. Se han aislado más de 10 limonoides aleloquímicos de varias partes del árbol. De todos los compuestos aislados de la planta, la azadiractina es el alcaloide más tóxico, posee actividad insecticida contra muchas plagas de insectos de importancia económica (Gopal y col., 2007). Hasta la fecha se han aislado más de 300 productos naturales de diferentes partes del árbol y nuevos compuestos se añaden a la lista cada año, entre estos compuestos, los limonoides forman el grupo mayor. En 1968 Butterworth y Margan aislaron la azadiractina como el componente principal del neem, esta puede ser encontrada en pequeñas cantidades en todas las partes del árbol, pero se encuentra en mayor concentración en las semillas maduras (Schaaf y col., 2000), alcanzando aproximadamente el 40% en el aceite de estas. Existen muchos productos comerciales que contienen extracto de Neem, un ejemplo es Neem Azal F © (trifolio-M GmnH, Alemania) que contiene 5% de azadiractina. Este producto se conoce ampliamente y se ha utilizado en una gran variedad de estudios para el control de plagas fitófagas (Abdel-Shafy y Zayed, 2002), siendo este uno de los productos comerciales más utilizados por los diferentes grupos de investigación para llevar a cabo ensayos en otras áreas.

Se han llevado a cabo numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* utilizando extractos de Neem sobre diferentes especies de garrapatas con resultados alentadores. Para las diferentes especies de *Hyalomma* se pueden mencionar los siguientes antecedentes:

En estudios *in vitro* utilizando Neem Azal F © sobre huevos, larvas, ninfas y adultos de garrapatas *Hyalomma anatolicum excavatum*, se redujo de forma significativa el porcentaje de eclosión de los huevos, la cual se adelantó con respecto a los no tratados, ocasionando que las larvas salieran del huevo prematuramente, sin haber terminado su desarrollo y murieran a las pocas horas y sin llegar a alimentarse. No hubo, sin embargo, efecto sobre la muda de ninfas alimentadas, pero si se observó un incremento en la mortalidad de adultos sin alimentar (Abdel-Shafy y Zayed, 2002).

En *Hyalomma dromedari* se llevó a cabo un ensayo utilizando larvas, en donde el extracto de Neem redujo la alimentación, prolongó el tiempo de muda de larva a ninfa y redujo la muda al 60%. Sobre otras especies de garrapatas como, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, se observó la inhibición de la producción de huevos, cuando las garrapatas fueron sumergidas en extractos de *Melia azedarach*. También aplicado sobre animales resultó eficaz, al disminuir la infestación en cabras y ganado bovino, cuando fueron rociados semanalmente con extractos de neem. En un estudio donde se administró neem por vía oral a corderos infestados con adultos de *D. variabilis*, se demostró que a las dosis administradas (0,6% con base a la materia seca de la dieta) no es tóxico y a la vez disminuye la ingestión de sangre en hembras adultas de *D. variabilis* (Landau, 2009).

Otro método de administración de neem ha sido por vía oral. Se cree que administrado de forma oral en base diaria, puede alcanzar concentraciones estables en la sangre ya que se absorbe bien y no se metaboliza completamente por el hígado (Landau y col., 2009).

El uso de la azadiractina como aditivo en la dieta, para el control de las garrapatas en ganado, sería una forma respetuosa con el ambiente, ya que los residuos son inocuos al ser expulsado con las heces, la luz solar los descompondría, y no constituirían un contaminante ambiental, como ocurre con otros acaricidas orales, como por ejemplo la ivermectina.

En conclusión, debido a su baja toxicidad para los mamíferos y su mínima persistencia ambiental, los PDPs pueden ofrecer una atractiva opción para el manejo de plagas en el futuro cercano (George y col., 2008a).

El desarrollo de agentes de control biológico contra garrapatas está avanzando rápidamente, pero aún se requieren progresos en la comercialización de estos productos, lo cual implica la adaptación de las grandes compañías en áreas como la producción, almacenamiento y métodos de envío. Así como la educación de los consumidores. Afortunadamente el número de científicos trabajando en esta área sigue incrementándose lo cual es sumamente esperanzador.

Finalmente los Protectores Incorporados a Plantas (PIP's), son otro tipo de biopesticidas. Consisten en sustancias pesticidas que las plantas producen gracias a cierto material genético que ha sido incorporado a las mismas. Por ejemplo, los científicos pueden extraer el gen de Bt que produce la sustancia pesticida, e introducir el gen dentro del propio material genético de la planta, de manera que es la planta quien produce la sustancia que mata a la plaga.

Existen plantas conocidas como anti-garrapatas, en regiones cálidas, las leguminosas *Stylosanthes*, *Melinis* y *Gynandropsis* poseen pelos o sustancias acaricidas que repelen, atrapan o matan gran número de garrapatas y podrían ser utilizadas en el manejo del ganado en pastoreo.

2.10. CONTROL INTEGRADO

Por todo lo expuesto, queda claro que el control de las garrapatas es tan complejo como difícil de desarrollar y debe adaptarse, tanto a las condiciones climáticas y de explotación, como a la fisiología de la especie de ixódido a controlar. Por ello, es muy difícil la importación de técnicas o metodologías eficaces de otro lugar o frente a otra especie. Es necesario conocer profundamente la fenología de la garrapata a controlar y las condiciones climáticas de la zona para desarrollar un plan de control específico y adaptado. Así pues, los datos climáticos combinados con los de la ecología de las garrapatas son imprescindibles para el éxito de cualquier plan de control (Jongejan y Uilenberg, 2004).

Es de suma importancia establecer el tipo de ciclo de las garrapatas ya que esto influirá en las estrategias de control que habrán de adoptarse. Es más fácil combatir garrapatas monofásicas donde todos los estadios se alimentan sobre el mismo hospedador, mediante el uso de vacunas o baños con acaricidas, que aquellas garrapatas difásicas o trifásicas, donde el primero puede ser un roedor pequeño, el segundo un conejo o ave y el tercero ganado doméstico, lo cual implica mayores retos de manejo para cada una de las especies hospedadoras involucradas.

Con esta nueva aproximación donde se incluye una visualización completa del problema, se han creado estrategias específicas bajo el término control integrado que reduce, no elimina, una población de garrapatas o cualquiera otra plaga.

Queda claro que uno de los principales componentes de los programas de control integrado es la aplicación de acaricidas, sin embargo debido a su eficacia limitada y los ya mencionados efectos indeseables, el uso de estos químicos representa una parte cada vez menor. Además el desarrollo de nuevos acaricidas es un proceso largo y costoso, todo esto refuerza la necesidad de buscar alternativas para el control de las infestaciones por garrapatas (de la Fuente y col., 2007).

El fundamento más importante a tomar en cuenta en el diseño de un programa de control integrado, es reducir el número de tratamientos pesticidas al mínimo. Un ejemplo de este tipo de estrategias consiste en disminuir el uso de acaricidas incrementando el control de las generaciones de primavera y otoño de garrapatas mediante otros métodos. En este caso se recomienda disminuir el movimiento de ganado, y aplicar el tratamiento cada 3 semanas a principios de primavera o durante el verano, que es cuando las garrapatas se encuentran en su estado parasitario (George y col., 2008b)

En el momento de cambio global que se está experimentando, las garrapatas también están sufriendo modificaciones en cuanto a su distribución y abundancia, por lo que sus consecuencias son hoy por hoy impredecibles. Para Cumming y Van Vuuren (2006), las condiciones climáticas en África y el resto de mundo se volverán más favorables para las garrapatas africanas, constituyendo también una amenaza en Australia, América latina, partes de Asia y Europa (Polar y col., 2008).

Así pues, el reto actual en el control de las garrapatas, fundamentalmente en zonas endémicas como la nuestra, es limitación de la población de estas a niveles tolerables que permitan su estabilidad, mediante métodos respetuosos con el medio, pero eficaces. No existe, al día de hoy, ninguna estrategia eficaz al cien por cien, por lo que es imprescindible desarrollar un

plan estratégico de acción a distintos niveles en lo que se ha dado en llamar Manejo Integrado de Plagas (Integrated Pest Management ó IPM).

La efectividad de estos programas depende de un mejor conocimiento de la asociación dinámica entre los agentes causales de enfermedades, sus hospedadores vertebrados, garrapatas vectores y el medio ambiente. Así mismo en los países donde las garrapatas han sido eliminadas se deben reforzar o implantar estrictos programas de cuarentenas para prevenir la re-introducción. Actualmente se utilizan programas de modelos climáticos y sistemas de información geográfica para identificar áreas no afectadas en donde las garrapatas podrían convertirse en plaga si fueran introducidas.

Por lo tanto el control integrado de plagas y vectores se ha identificado como la opción futura más sostenible para el control de garrapatas (Ghosh y col., 2007). El IPM involucra la aplicación sistemática de dos o más tecnologías de control de población de garrapatas. Estas deben ser sostenibles, respetuosas con el ambiente, con buena relación coste-efecto, y deben superar los logros alcanzados con una sola tecnología de control de garrapatas aplicada por sí sola. Un ejemplo de esto es la vacuna Tick GARD, la cual fue comercializada en Australia como un pequeño paquete IMP, combinando la aplicación de vacunas con el uso de acaricidas para el control de garrapatas a corto plazo.

Experiencias similares se ha documentado en Cuba y México. El control integrado de plagas como concepto es más fácilmente aplicable a situaciones donde el problema es adecuadamente definido, lo cual llega a ser complicado debido a la diversidad de situaciones que se dan entre las garrapatas y sus diversos hospedadores (Willadsen, 2006).

Según George y col. (2008b), los elementos potenciales para el control integrado de garrapatas pasan por las siguientes opciones: 1) Incrementar la resistencia del hospedador hacia las garrapatas introduciendo ganado con altos niveles de resistencia heredables, 2) utilización de baños por inmersión profilácticos o bien baños por inmersión oportunos cuando las guías sugieran que esta aproximación es particularmente apropiada, 3) reducir el rango de encuentro entre garrapatas y hospedador cambiando la

densidad de hospedadores y rotando los pastos para evitar el contacto entre garrapatas sin alimentar y el ganado. Sin embargo, según la especie y zona, debería también trabajarse a otros niveles: a) Control de los estadios inmaduros y b) control de los estadios no parásitos.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El ecosistema mesomediterráneo constituye el hábitat idóneo para especies de garrapatas autóctonas que en determinadas condiciones de desequilibrio ambiental pueden llegar a constituir un problema sanitario para el ganado, animales silvestres e incluso el ser humano. La fenología de estas especies, perfectamente adaptada al entorno silvestre dificulta la aplicación de sistemas convencionales de control. A esta dificultad se suma el hecho de que no existen programas adaptados a las condiciones ambientales ni para estas especies concretas, al haberse desarrollado fundamentalmente para el control de especies del género *Ixodes* con requerimientos y fenología completamente distintos. Finalmente, la sociedad demanda cada vez un mayor respeto al medio mediante la utilización de productos y métodos compatibles con la agricultura y ganadería ecológicas. Así, en la actualidad no existen herramientas que permitan el control integrado de garrapatas autóctonas de clima mesomediterráneo.

La conciencia de esta necesidad surge cuando nos la plantea la dirección de la finca “La Garganta”, una propiedad reconocida en 2006 con el Belleuropa Award Drop of Nature, por su “Excepcional valor como modelo de una gestión cinegética sostenible, creadora de biodiversidad y conservadora del paisaje, flora y fauna”, y solicitan un sistema integrado de control de garrapatas. La imposibilidad de aplicar los programas desarrollados para otras especies y el desconocimiento de la fenología de las garrapatas autóctonas fueron la principal motivación del trabajo cuyos objetivos son:

1. Descripción de la ixodifauna del ecosistema mesomediterráneo
2. Fenología de *Hyalomma lusitanicum*
3. Alternativas ecológicas para el control integrado de la población de garrapatas de ecosistema mesomediterráneo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. ESTACIÓN DE ESTUDIO DE LOS ENSAYOS DE CAMPO

Las pruebas de campo se llevaron a cabo en la finca “La Garganta” de 13.600 Ha de extensión, localizada en el sur de la provincia de Ciudad Real a 37°24′78″N 42°59′101″E, con una altura media de 669 metros sobre el nivel del mar. En su mayor parte, está constituida por un piso mesomediterráneo con una vegetación predominante de bosques y dehesas de encinas (*Quercus ilex* L), olivos (*Olea europea* L) y eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*), en tanto que en la zonas de sierra, el piso es supramediterráneo, predominando los pinos silvestres (*Pinus sylvestris* L) y encinas (*Quercus spp*).

La finca se gestiona de acuerdo a dos prioridades, la primera es la conservación del medio natural autóctono y la segunda una limitada actividad cinegética. Debido a esto las poblaciones de ciervo (*Cervus elaphus*), jabalí (*Sus scrofa*) o corzo (*Capreolus capreolus*) son elevadas, así como las de perdices y conejos, estos últimos de suma importancia en la cadena trófica de animales protegidos como el águila imperial (*Aquila heliaca adalberti*) y el lince ibérico (*Lynx pardinus*).

Como en otros muchos entornos de ecosistema mesomediterráneo en ciertas zonas de la finca la población de garrapatas en los meses cálidos es extremadamente abundante en la vegetación.

4.2. IXODIFAUNA Y DINÁMICA ESTACIONAL

Como parte del primer objetivo se planteó la recolección de ejemplares, para lo cual se estableció un programa de muestreos durante los años 2007, 2008 y 2009.

4.2.1. MUESTREOS DE GARRAPATAS EN VEGETACIÓN

Puntos de muestreo

Durante el primer año, se seleccionaron 9 puntos estratégicos representativos de los distintos hábitats naturales presentes en la finca,

tales como los encinares, (puntos 2, 4 y 5) y riberas de los arroyos (puntos 7, 8 y 9), así mismo se seleccionaron puntos de hábitats establecidos por intervención humana como el olivar, (punto 1) y los eucaliptales, puntos (3 y 6) (Figura 9).



Figura 9. Puntos de muestreo de garrapatas en la vegetación en la finca “La Garganta”.

Durante los años 2008 y 2009 los esfuerzos se centraron en los puntos 1-6 descartando los tres últimos debido a la casi nula presencia de garrapatas en ellos.

En el periodo de estudio (2007-2009), se procedió al muestreo de los puntos seleccionados salvo en aquellos momentos en los que las condiciones climáticas lo impidieron (enero de 2008 y 2009, febrero 2009, mayo 2008, noviembre 2008 y 2009 y diciembre 2009). En cada muestreo se cumplimentaba una ficha con datos climáticos y ambientales, salvo en casos puntuales en que no pudieron ser recogidos los datos de temperatura y humedad en junio y julio 2007 y septiembre 2008.

Recogida de garrapatas

Los muestreos en vegetación se realizaron por medio de la técnica de la bandera o de arrastre modificada (Sonenshine, 1993). Esta técnica consiste en arrastrar lentamente una pieza de felpa blanca con una dimensión de 1,80 x 2m sobre la vegetación y suelo de las áreas de muestreo (Figura 10), con el fin de atraer hacia ella las garrapatas que se encuentran en la vegetación en busca de un hospedador.

La felpa actúa como cebo, ya que aprovecha la habilidad de las garrapatas de detectar las vibraciones producidas por el paso de los animales, saltando las garrapatas sobre ella. Una vez estas se enganchan a la felpa, se recolectan manualmente y se colocan en contenedores sellados. El color blanco de la felpa permite visualizar fácilmente las garrapatas debido al contraste con los colores usualmente pardos de estas. Así mismo el protocolo dicta que la felpa debe arrastrarse sobre el suelo y vegetación durante intervalos de tiempo pre-establecidos, los cuales serán siempre iguales en todos los puntos de muestreos y en cada muestreo consecutivo, siendo el tiempo habitual de 30 minutos. Es necesario revisar y recolectar los individuos enganchados en la felpa en intervalos cortos de tiempo, recomendándose cada 3 a 5 minutos ya que las garrapatas tienden a bajarse de la felpa una vez detectado el engaño.



Figura 10. Técnica de la bandera para colección de garrapatas de vegetación y suelo y contenedores de transporte.

Otros datos recogidos

Durante el muestreo también se cumplimentaba una ficha con los siguientes datos de cada punto:

MUESTREO DE GARRAPATAS EN VEGETACION FINCA "LA GARGANTA"				
Punto de muestreo:		Provincia:		
Número de muestreo:		Fecha de muestreo:		
Hora inicio:		Tiempo de muestreo (min):		
Tª ambiente:		Tª suelo:		
Humedad relativa ambiente (%):		Humedad relativa suelo (%):		
Tipo de día (X):	Soleado:	Nublado:	Lluvia:	Nieve:
Estado del suelo:	Seco:	Mojado:	Encharcado:	Nevado:
Viento: Ausencia:	Leve:	Moderado:	Fuerte:	
Altura de vegetación:	Alta (>30cm):	Media (15-30):	Baja (<15cm):	
Presencia de animales:	Vacuno	Equino	Ovino	Otros
Incidencias:				
Persona que realiza el muestreo:				

Las garrapatas recogidas se introdujeron en viales de transporte debidamente etiquetados. Posteriormente se examinaron en laboratorio donde se identificaron utilizando las claves de Gil Collado (1979), y las claves de Estrada Peña y col., (2004). Finalmente se cuantificó el total de individuos y se clasificaron por especie, estadio de desarrollo, sexo y muestreo.

Índice de Abundancia de Garrapatas

Para cuantificar las garrapatas recogidas en la vegetación se calculó el Índice de Abundancia de Garrapatas (IAG) mediante la siguiente fórmula:

$$IAG = \frac{n^{\circ} \text{ de garrapatas capturadas}}{n^{\circ} \text{ de minutos muestreados}} \times 100$$

Con el IAG se evaluaron las condiciones y niveles de infestación del campo y se establecieron los protocolos de actuación. Así mismo este índice se utilizó como herramienta para evaluar los resultados de los tratamientos aplicados, durante los ensayos.

4.2.2. MUESTREO DE GARRAPATAS EN HOSPEDADORES

Con fin de completar el conocimiento de la ixodifauna de la zona, durante los tres años de trabajo, simultáneamente se llevaron a cabo muestreos mensuales en animales. Cada mes se tomaron muestras de un ciervo, un jabalí y al menos cuatro conejos. Las garrapatas se localizaron por inspección directa de los animales y se recogieron manualmente. Durante el último año se modificó la técnica de recogida de garrapatas en los conejos, al confirmarse la imposibilidad de cuantificación completa de los estadios de menor tamaño (larvas y ninfas). Para mejorar la técnica se aprovechó la tendencia de las garrapatas a abandonar los cadáveres al bajar la temperatura corporal. De esta forma, los conejos abatidos se colgaron sobre un contenedor con agua, donde caían en 24h todas las garrapatas que parasitaban al hospedador. Posteriormente las garrapatas se recuperaron filtrando el agua por coladores con gasa.

Todas las garrapatas obtenidas de animales, se transportaron al laboratorio en viales debidamente etiquetados para su posterior recuento e identificación específica (Gil-Collado, 1979 y Estrada y col., 2004).

Con el fin de cuantificar la carga parasitaria se determinó el Índice de Parasitación (IP) mediante la siguiente fórmula:

$$IP = \frac{\text{total de garrapatas recogidas por especie hospedadora}}{n^{\circ} \text{ de animales muestreados de esa especie}}$$

4.3. CICLO DE *H. lusitanicum* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Se procedió a cerrar el ciclo completo de *H. lusitanicum* en condiciones de laboratorio obteniendo fases que no se recogen habitualmente en el campo y datos de tiempos del ciclo vital.

La colonia se inició en enero de 2009 con 7 hembras grávidas recogidas de sus hospedadores (ciervos), durante los muestreos en animales. Todos los individuos y estadios se mantuvieron a 22-24 °C, en desecadores con una humedad relativa superior al 70 % en tubos de 5 ml con un papel en zig-zag en su interior y cerrados con algodón hidrófilo.

Cuando una teleogina era introducida en un tubo de ensayo se le asignaba un código de identificación, de acuerdo a su especie, mes y año de recogida (HI 02/09), y se le abría una ficha donde se recogían todos los datos relativos a la hembra y su descendencia y se anotaban diariamente las incidencias del ciclo. El periodo de prealimentación establecido fue de 15 días después de la eclosión o muda. Los estadios inmaduros se alimentaron sobre conejo según la técnica de Bailey (1960), (Figura 11). A continuación se describe el proceso paso a paso.

Collares isabelinos. El objetivo de los collares era impedir que los conejos eliminaran el apósito con larvas de sus orejas. No pudiendo adaptarse los collares isabelinos debieron ser manufacturados. Los collares se fabricaron manualmente con láminas de poliestireno de 2 mm de grosor, la dimensión se calculaba midiendo el diámetro del cuello y la distancia hasta las puntas de las orejas. El cuello del conejo se protegía del roce forrando los bordes del collar con algodón y esparadrapo. Una vez colocados los collares se procedió con un periodo de observación de 24 horas para asegurarse que los collares permanecieran correctamente colocados y al mismo tiempo verificar que los animales pudieran desarrollar normalmente su actividad y no les indisponía para beber o alimentarse.

Colocación de la bolsa contenedora en la oreja. Transcurridas 24 horas se procedía a la colocación de unas bolsas rectangulares de tela, también manufacturadas, con unas dimensiones adaptadas al tamaño de la oreja de cada animal, que se introducía en la bolsa. El extremo inferior de la bolsa se adaptaba a la base de la oreja mediante un cierre de cordón y el superior con velcro. La fijación de la bolsa se garantizaba con esparadrapo (Olmeda, 1992).

Aplicación de larvas/ninfas. Las larvas/ninfas se colocaban dentro de la bolsa contenedora por la apertura superior, desde los tubos o bien individualmente mediante un pincel, cuando era necesario el recuento. Al finalizar se procedía al cierre del velcro y se reforzaba la unión con esparadrapo.



Figura 11. Técnica de Bailey para la alimentación de larvas, ninfas y adultos de garrapatas sobre conejos.

Al contrario que las larvas y ninfas, **los adultos** de *H. lusitanicum* no se alimentan en la naturaleza en conejos y aunque en condiciones de laboratorio puede llegar a forzarse la alimentación, las lesiones que provocan en el animal desaconsejan este método. Así, los adultos obtenidos de las fases anteriores de alimentación se dejaron madurar durante 20 días y se alimentaron sobre ovejas, mediante la técnica del apósito diseñada por nuestro equipo. Esta técnica consiste en adherir, a una zona depilada de la piel, con pegamento quirúrgico una tira de velcro formando un cuadrado que se adapta a un apósito de tela. Este mecanismo permitía retirar y recolocar el apósito para colocar los adultos y su observación diaria posterior hasta la depleción de las hembras. (Figura12).



Figura 12. Alimentación de garrapatas adultas sobre ovejas, mediante la técnica del apósito dorsal.

A continuación se muestra la ficha de seguimiento de las garrapatas en a colonia:

Especie de garrapata:	
Número de garrapata:	
Fecha de recogida:	
Lugar de recogida:	Nº de generación:
Especie animal:	
Fecha de incubación de la Hembra	Temperatura/HR
Fecha de inicio de Oviposición	T. preoviposición
Fecha de inicio de Eclosión	T. eclosión
Observaciones:	
LARVAS	
Alimentación (hospedador/nº)	Temperatura/HR
Fecha inicio alimentación	T. alimentación
Fecha inicio de recogida	
Inicio de muda	Temperatura/HR
Final de muda	Periodo de muda
OBSERVACIONES	
NINFAS	
Alimentación (hospedador/nº)	Temperatura/HR
Fecha inicio alimentación	T. alimentación
Fecha inicio de recogida	
Inicio de muda	Temperatura/HR
Final de muda	Periodo de muda
OBSERVACIONES	
ADULTOS	
Alimentación (hospedador/nº)	Temperatura/HR
Fecha inicio alimentación	T. alimentación
Fecha inicio de recogida	
Número de hembras recogidas	Temperatura/HR
OBSERVACIONES	

4.4. PRODUCTOS.

Los productos empleados en los ensayos fueron:

- Ácido oxálico 2 hidrato, Panreac 131041, 98% de pureza. Polvo.
- Espinosad: se empleó el producto comercial Elector®, con una concentración de 480 g/l de espinosad, comercializado por Elanco®. Líquido.
- Clorenforte® (fenitotrión 25% + cipermetrina al 2,5%). Se empleó como control positivo en ensayos. Líquido.

4.5. ENSAYOS

Se realizaron ensayos agrupados en **ensayos en suelo** y **ensayos sobre animales *in vivo***, estos últimos se distinguen a su vez en varias fases según se realizan en **condiciones de laboratorio**, en **condiciones semicontroladas** y en **condiciones de campo**.

4.5.1. EFICACIA IXODICIDA DEL ÁCIDO OXÁLICO EN CONDICIONES DE CAMPO

El ácido oxálico (AO) fue uno de los productos seleccionados para aplicar en la zona de estudio, debido a la eficacia ixodícida en condiciones de laboratorio, según se recoge con anterioridad en esta memoria. El objetivo de estos ensayos fue determinar si el producto era también eficaz en condiciones de campo y en su caso, las diluciones de trabajo. Para ello se diseñó un protocolo de actuación donde se consideraron tres procedimientos básicos: muestreo previo a la aplicación de los tratamientos, aplicación de los distintos tratamientos y muestreo posterior.

Finalmente, los ensayos se dividieron en dos grupos atendiendo al método de aplicación que venía, básicamente condicionado por la accesibilidad de los vehículos a las zonas (Tabla 2). Así, en zonas de difícil accesibilidad se utilizó el método de la manguera, como se describirá posteriormente, y en

las accesibles se aplicó por dispersión utilizando un aparato de ultra bajo volumen (UBV Dinamic Olivo Qi 9.0 Ecoteq FEDE ®).

Se realizaron en total once ensayos siempre en días soleados y sin viento y tras comprobar que el número de garrapatas adultas en vegetación era elevado. En cada muestreo se abrió una ficha con datos correspondientes a temperatura y humedad relativa a nivel de suelo y en el aire, altura de la vegetación y presencia de viento (Tablas 3 y 4).

AO (kg)	Volumen de agua (l)	Concentración (%)	Superficie cubierta (m ²)	Método de aplicación
25	400	6,3	1.500	Manguera
12	400	3,0	1.500	Manguera
4	400	1,0	1.500	Manguera
2	400	0,5	1.500	Manguera
25	250	10,0	4.000	UBV

Tabla 2. Concentraciones de ácido oxálico (AO), volumen de agua empleada y superficie cubierta según el medio de aplicación del AO para el control de garrapatas en fase libre (*Hyalomma lusitanicum*) en un área mesomediterránea.

Ensayo	Fecha	Area	Concentración OA (%)	Tº (° C)		HR (%)	
				Suelo	Aire	Suelo	Aire
1	Junio 08	Encinar	6,3	33,00	32,00	26	23
2	Julio 08	Encinar	6,3- 3,0	28,72	28,23	28	27
3	Julio 09	Encinar	6,3- 3,0- 1,0- 0,5	29,00	28,22	22	23
4	Mayo 09	Olivar	6,3- 3,0- 1,0- 0,5	29,82	28,14	36	34

Tabla 3. Características del área de estudio y dosis de ácido oxálico (AO), aplicadas sobre la vegetación, mediante manguera, para el control de garrapatas en fase libre (*Hyalomma lusitanicum*) en un área mesomediterránea.

ENSAYO DE APLICACIÓN DEL AO CON MANGUERA

Por la experiencia adquirida sobre la fenología de *H. lusitanicum* conocíamos que la distribución de los adultos no era homogénea en la vegetación, por eso para los ensayos de tratamiento con manguera en campo se utilizó un diseño de cuadrados latinos con parcelas de 3 x 3 a 5 x 5 (según el número de diluciones ensayadas) con parcelas de 1,500m² separadas por pasillos de 10m de ancho (Figura 13).



Figura 13. Ejemplo del diseño de cuadrados latinos estratificados 5 X 5. Utilizados en los ensayos de diluciones de ácido oxálico (AO). Se indica el número de parcela con números consecutivos, y las concentraciones de AO aplicadas en cada una de ellas de 0,5%, 1% y 3%. T-= control negativo y T+= control positivo (fenitotrión + cipermetrina 0,15%).

Además de las diluciones de ácido oxálico, en cada ensayo se incluían parcelas que denominábamos de control positivo (+C) ya que en ellas se aplicaba un producto de reconocida acción ixodocida en condiciones de campo y garantizaban la eficacia del método de aplicación, y controles

negativos (-C) que se regaban tan sólo con agua, ya que el aumento de la humedad podía modificar la actividad de las garrapatas y estas parcelas permitían comparar en idénticas condiciones el efecto de los productos. El número total de parcelas fue de 71 (46 en encinar y 25 en un olivar ecológico) realizándose un total de cuatro ensayos que cubrieron un área total de 106,500m². Los ensayos se realizaron entre en mayo de 2007 y octubre de 2009.

Se utilizaron tantos tanques como soluciones de AO se ensayaban (recién preparadas con agua caliente) (Figura 14) más uno con control positivo (+C): a 0,15% de FitoGal® (Fenitotrión 25% + Cipermetrina 2,5%) y otro para control negativo (-C) con agua. Los tanques fueron adaptados a tractores, se transportaron a las áreas de estudio y se invirtieron 45 minutos para aplicar 400 litros de cada solución por parcela con una presión de 7-8 bares.



Figura 14. Preparación de las diluciones de ácido oxálico, transporte hacia las parcelas y aplicación mediante manguera. Se pueden observar las banderillas de marcación.

ENSAYO DE APLICACIÓN DEL AO CON UBV

Entre mayo y octubre de 2011, se realizaron siete ensayos utilizando un aparato de ultra bajo volumen (UBV) acoplado a un tractor (Figura 15), cubriendo una superficie total de 56,000 m². Para cada ensayo se seleccionó un sendero de 410m de largo dividido en parcelas de 200m de largo x 20m de ancho (10m a cada lado del sendero: superficie tratada: 4,000 m²) separadas por un pasillo de 10m. Una parcela se trató con una solución de AO 10% y la otra no recibió tratamiento y se utilizó como control

negativo. Cada tratamiento fue aplicado en un periodo de 10 minutos utilizando un volumen total de 250l. La velocidad del tractor durante la aplicación del tratamiento fue de 1,2 km/h.

Ensayo	Fecha	Área	Concentración OA (%)	T ^a (° C)		HR (%)	
				Suelo	Aire	Suelo	Aire
5	Oct 11	Eucaliptal	10,0	26,20	26,00	29	28
6	Oct 11	Pinar	10,0	24,00	23,50	32	32
7	Oct 11	Encinar	10,0	28,00	27,40	22	22
8	Oct 11	Encinar	10,0	28,90	30,30	23	18
9	Oct 11	Encinar	10,0	20,00	19,40	32	33
10	Oct 11	Encinar	10,0	24,90	23,90	25	27
11	Oct 11	Encinar	10,0	32,40	32,00	-	-

Tabla 4. Características del área de estudio y dosis de ácido oxálico (AO), aplicadas sobre la vegetación, mediante UBV, para el control de garrapatas en fase libre (*Hyalomma lusitanicum*) en un área mesomediterránea.



Figura 15. Aplicación del ácido oxálico mediante aparato de ultra bajo volumen. UBV. Dinamic Olivo Qi 9.0 Ecoteq FEDE®

Garrapatas en búsqueda de hospedador

Para verificar la abundancia en la población de garrapatas, 24 horas antes de aplicar los tratamientos los pasillos de separación de las parcelas de estudio fueron muestreados utilizando la técnica de arrastre de bandera. De

la misma manera, 24 horas después de los tratamientos, se recolectaron las garrapatas de cada uno de las parcelas tratadas y sin tratar con ácido oxálico o fenitotrión y cipermetrina y controles negativos.

Se utilizaron banderas específicas para cada tratamiento y dilución aplicada. Para la estimación de las garrapatas tras los tratamientos se organizaron tantos equipos de dos personas como tratamientos aplicados (soluciones de AO más controles positivo y negativo) de tal manera que cada equipo muestreaba todas las réplicas de un mismo producto de forma sincronizada con los demás para evitar posibles desviaciones debidas a los diferentes tiempos de muestreo.

Evaluación de la eficiencia

Se utilizó, el Índice de Abundancia de garrapatas (IAG) descrito con anterioridad, si bien en este caso referido, exclusivamente a *H. lusitanicum*.

Aunque la comprobación de abundancia de garrapatas se realizaba el mismo día, previamente al tratamiento, ese dato no se utilizó para la evaluación de la eficacia, por cuanto esta se medía 24 horas después y las condiciones ambientales podían cambiar y suponer una variable en la actividad de las garrapatas en vegetación, además, el hecho de que el tratamiento se aplicara en forma líquida constituía de por si un cambio en la humedad relativa que también podía afectarlas.

Por todo ello, la eficacia entre parcelas tratadas y controles negativos de cada ensayo a las 24 horas de la aplicación, se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Reducción (\%)} = \frac{\text{IAG en control negativo} - \text{IAG en tratadas}}{\text{IAG en control negativo}} * 100$$

4.5.2. ENSAYOS *IN VIVO*

4.5.2.1. Ensayos en conejos experimentalmente infestados en condiciones controladas de laboratorio

El objetivo de este tipo de ensayos fue determinar sobre conejos de laboratorio artificialmente infectados y en condiciones de laboratorio, la actividad ixodícida y repelente de los productos evaluados,

Como fuente de espinosad se empleó el Elector® (Espinosa 48% = 480 g/l. laboratorio Elanco, España) que se presenta en botellas de 237 ml.

Animales de experimentación. Se utilizaron conejos de la raza Nueva Zelanda/California de entre 4 semanas y 3 meses de edad. Todos los animales fueron sometidos a un periodo de adaptación superior a 10 días antes de iniciar los ensayos. Se les alimentó con 150 g/día de pienso para conejo (Harlan ®). Se utilizaron jaulas individuales para conejos, con bebedero tipo botella y comedero individuales.

Así mismo todos los animales fueron mantenidos y manipulados siguiendo la normativa y con los permisos correspondientes de la Comisión de Ética de la UCM. Una vez finalizada la experiencia los animales fueron sacrificados directamente mediante inyección letal en la vena auricular con pentobarbital sódico.

Las garrapatas empleadas fueron larvas y ninfas *H. lusitanicum* y larvas de *R. sanguineus*. Esta última especie se incluyó debido a que la única referencia que había publicada sobre la eficacia de las espinosinas frente a garrapatas era en esta especie (Snyder y col., 2009). Para la incubación de las garrapatas se utilizó desecador y estufa, siguiendo el mismo protocolo de mantenimiento de la colonia mencionado anteriormente.

Todas las larvas y ninfas utilizadas en los ensayos pasaron un período de prealimentación superior a 7 días.

Se realizaron 3 ensayos:

- Ensayo 1. Se evaluó la actividad ixodicida del espinosad en conejos frente a larvas de *H. lusitanicum*, obtenidas de una garrapata hembra recogida de un ciervo abatido en la finca de estudio.
- Ensayo 2. Se evaluó la palatabilidad de distintas dosis de espinosad administrado con el pienso para conejos.
- Ensayo 3. Se evaluó la actividad ixodicida, dosificación y la palatabilidad del pienso tratado con espinosad en conejos frente a ninfas de *H. lusitanicum*, obtenidas de nuestra colonia.

ENSAYO 1: Eficacia ixodicida del espinosad administrado por vía oral en infecciones experimentales

Se emplearon 6 conejos de 4 semanas de edad de 2 kg de peso. Los animales fueron asignados aleatoriamente al grupo tratado o al control, de forma que cada grupo estaba formado por 6 conejos. El grupo tratado recibió Elector®, 480 mg/kg por animal, administrado con una jeringa desechable por vía oral forzada y el grupo control recibió 1 ml de agua destilada de la misma forma (Figura 16).



Figura 16. Administración de los tratamientos por medio de jeringa (izquierda) y revisión de bolsas y recolección de larvas (derecha).

PROTOCOLO DEL ENSAYO 1:

Día 0. Colocación de los collares. Con el propósito de evitar que los conejos se retiraran las larvas, se les colocaron collares siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Día 1. Aplicación de larvas. Con el fin de corroborar el efecto ixodícida, se aplicaron 100 larvas 24 horas antes de proceder con la aplicación de los tratamientos. Las larvas se aplicaron una a una utilizando un pincel.

Día 2. Aplicación de tratamientos. Antes de proceder con tratamientos, nos cercioramos de que las larvas se hubiesen fijado. El tratamiento y el control se aplicaron por vía oral forzada empleando jeringuillas desechables. La dosis empleada fue de 480 mg/kg de espinosad, en un volumen total de 1 ml para los conejos tratados. Para el grupo control se administró 1 ml de agua.

Día 3. Segunda aplicación de larvas. Con el fin de corroborar el efecto repelente e ixodícida se colocaron 100 larvas de *H. lusitanicum* en la oreja opuesta de cada conejo de ambos grupos.

Cada 24 horas se revisaron las bolsas de todos los conejos, para recuperar las larvas no prendidas, así como para recolectar las larvas alimentadas. Las larvas alimentadas vivas, se colocaron en incubación a una temperatura de 22–24°C y humedad relativa de 70%. Se registró la mortalidad, tiempo de muda, viabilidad y mortalidad post muda.

En la tabla 5 se resume el calendario del ensayo.

Producto	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4-Final
Espinosad oral	Colocación de collares	Aplicación de larvas	Administración de Espinosad	Aplicación de larvas	Seguimiento
Control	Colocación de collares	Aplicación de larvas	Administración de agua	Aplicación de larvas	Seguimiento

Tabla 5. Detalle de las actuaciones llevadas a cabo en los ensayos de eficacia ixodícida en infestaciones controladas.

ENSAYO 2: Determinación de la dosis de espinosad ingerida libremente en pienso

Se emplearon 12 conejos, hembras de 3 meses de edad y 3 kg de peso. Los animales fueron repartidos aleatoriamente en 4 grupos de 3 animales cada uno a los que se enfrentaba a distintas dosis de espinosad (480 mg/kg, 240mg/kg, 60 mg/kg y 0 mg/kg –control-).

El pienso medicado se preparó mezclando 150 g de pienso con espinosad diluido en agua según la Tabla 6 y se dejó secar extendido durante un día.

PROTOCOLO DEL ENSAYO 2:

Día 0. Se preparó el pienso, medicado y control, y se colocaron los collares a los animales. Se distribuyeron aleatoriamente los animales en los distintos grupos.

Día 1. Se administró el pienso a los distintos animales.

Día 2. Se pesó la comida no consumida. Comprobándose el consumo del pienso medicado y de materia activa.

Dosis (mg/kg)	Espinosad (ml)	Agua (ml)
60	0,7	24,3
240	2,6	22,4
480	5,2	19,8
Control	0	25

Tabla 6. Dosis de espinosad que se aplicaron al pienso para determinar la dosis de espinosad que era ingerida libremente en pienso en condiciones controladas.

ENSAYO 3: Eficacia ixodicida del espinosad ingerido libremente en infecciones experimentales

Se emplearon 12 conejas de 4 semanas de edad de 1,5 kg de peso. Los animales fueron asignados aleatoriamente en 4 grupos a razón de 3

animales por grupo. A cada grupo se le administraba una dosis de espinosad (240, 120 o 60 mg/kg) y un grupo no recibió tratamiento, siendo utilizado como control. En los animales tratados el espinosad era diluido en un volumen total de 25 ml (Tabla 7) que se añadía a 150 g de pienso y se dejaba secar extendido en bandejas a temperatura ambiente 24 horas. Los conejos pertenecientes al grupo control recibían la misma cantidad de pienso, pero en este caso humedecido solo con agua y tratado de igual forma que el resto.

PROTOCOLO DEL ENSAYO 3:

Día 0. Colocación de collares.

Día 1. Aplicación de ninfas. Se aplicaron 25 ninfas de *Hyalomma lusitanicum* en la oreja izquierda.

Día 2. Aplicación del tratamiento. Se verificó que las ninfas estaban prendidas y se administró el pienso tratado o no tratado según la asignación por grupos.

Día 28. Aplicación de segundo lote de ninfas. Se aplicaron 25 ninfas de *Hyalomma lusitanicum* en la oreja derecha para ver el efecto residual del producto.

Diariamente los animales eran observados, retirándose las ninfas no prendidas o desprendidas y se evaluó la alimentación, el porcentaje y tiempo de muda.

Dosis (mg/kg)	Espinosad (ml)	Agua (ml)
60	0,7	24,3
120	1,3	23,7
240	2,6	22,4
Control	-	25

Tabla 7. Dosis de espinosad que se aplicaron al pienso para determinar su eficacia ixodícida cuando era ingerido libremente en infecciones experimentales.

4.5.2.2. Ensayos en condiciones semicontroladas en conejos de campo naturalmente infestados.

Los animales se capturaron en la zona de estudio en junio de 2010, los 3 días previos al ensayo. Al tratarse de infestaciones naturales, se esperaba encontrar en los conejos diferentes especies de garrapatas, principalmente *H. lusitanicum* en sus estadios inmaduros y diversas especies de *Rhipicephalus* en todos los estadios de su ciclo vital.

Los animales se mantuvieron durante el ensayo en cercados con valla metálica y piso de cemento de aproximadamente 3 x 10 m, con una zona cubierta y otra descubierta de libre acceso para los animales de forma que disponían de refugio, agua y alimento.

Al finalizar los ensayos los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. Como fuente de espinosad se empleó Elector®

Se realizaron otros 3 ensayos:

- Ensayo 4. Se evaluó la actividad ixodícida del espinosad administrado por vía oral en infecciones naturales.
- Ensayo 5. Se determinó la dosis de espinosad ingerida libremente por conejos silvestres en distintos alimentos.
- Ensayo 6. Se determinó la dosis de espinosad ingerida libremente en presencia de alimento no medicado.

ENSAYO 4: Eficacia ixodícida del espinosad administrado por vía oral en infecciones naturales.

El objetivo de este ensayo fue comprobar que la actividad ixodícida demostrada por el espinosad en conejos de laboratorio se mantenía en los conejos de campo, naturalmente infestados.

Para este ensayo se utilizaron 28 conejos silvestres capturados en la finca el 5 de julio de 2010. El peso de los animales osciló entre 0,8 g y 1,6 kg. Se marcaron con un crotal y se asignaron al grupo control o tratado en base a

la fecha de captura y peso (en ese orden) para que los dos grupos fuesen homogéneos, a razón de 14 conejos por grupo. El tratamiento aplicado consistió en la administración por vía oral forzada, mediante una jeringa de una dosis de 480 mg/kg de espinosad (1ml de Elector®) mientras que el grupo control recibió el volumen proporcional de agua. La administración se realizó empleando una jeringa desechable. Cada grupo se colocó en un cercado distinto y se alimentó con trigo y agua *ad libitum* durante toda la duración del ensayo.

PROTOCOLO DEL ENSAYO 4:

Día 0. Administración de tratamientos. Se organizaron los grupos y se les administró el tratamiento correspondiente.

Día 3. Sacrificio de los animales. Todos los animales fueron sacrificados y las garrapatas recogidas mediante la técnica del cubo de agua anteriormente descrita. Las garrapatas así recogidas se almacenaron en bolsas de plástico con cierre hermético, se rotularon y transportaron al laboratorio. Debido al escaso número de ejemplares recogidos de los cubos de agua de los conejos que recibieron espinosad, se procedió a la recogida integral de todas las garrapatas del cuerpo de esos conejos y se anotó si los ejemplares estaban vivos o muertos.

Una vez en el laboratorio, las garrapatas fueron cuantificadas y clasificadas por especie y estadio. La eficacia del tratamiento se evaluó comparando el número de garrapatas recogidas de uno y otro grupo.

ENSAYO 5: Determinación de la dosis de espinosad ingerida libremente en distintos alimentos.

El objetivo de este quinto ensayo fue determinar la ingesta diaria de distintos alimentos (pan/trigo) a libre disposición de los conejos silvestres. Estableciendo si existe alguna preferencia por algún tipo de alimento que pudiera ser utilizado posteriormente como vehículo para administrar el espinosad en condiciones de campo.

También se determinó si la dosis de espinosad ensayada por administración forzada, era consumida de manera voluntaria una vez mezclada en el alimento que se administró a libre disposición de los conejos silvestres.

PROTOCOLO DEL ENSAYO 5:

Día 0. Administración de los tratamientos: se organizaron los grupos y se administró el alimento de acuerdo a lo estipulado previamente. Para este ensayo se utilizaron 45 conejos silvestres, capturados en la finca el 21 de marzo de 2010. Los animales fueron divididos en cuatro grupos homogéneos con base a su peso colocándose cada uno en una perrera:

- Grupo 1: 17 conejos, agua *ad libitum* y trigo a razón de 150 g/conejo/día.
- Grupo 2: 10 conejos, agua *ad libitum* y 450 g de pan duro.
- Grupo 3: 18 conejos, agua *ad libitum*, trigo a razón de 150 g/conejo/día y una cantidad conocida de pan.
- Grupo 4: 10 conejos, agua *ad libitum* y 257,5 g de pan duro en trozos con 90 ml de espinosad (9 ml/ trozo de pan).

Día 1. Evaluación del consumo de alimento realizado por los animales. El grupo 3 se dividió en dos grupos de 9 animales, colocándose cada uno en un cercado. Se repuso el alimento del resto de los grupos, quedando los grupos de la siguiente forma:

- Grupo 1: agua y trigo *ad libitum*
- Grupo 2: agua *ad libitum* y 324 g de pan duro.
- Grupo 3a: 250 g trigo impregnado en 17,5 ml de espinosad.
- Grupo 3b: concentrado nutricional sólido a base de 300 g azúcar, agua, 250 g trigo y 17,5 ml de espinosad.
- Grupo 4: agua *ad libitum* y 200 g de pan duro troceado con 45 ml de espinosad.

Día 2. Evaluación del consumo.

ENSAYO 6: Determinación de la dosis de espinosad ingerida libremente en presencia de alimento no medicado

En este ensayo se determinó el consumo real de alimento tratado a distintas dosis, si el animal disponía de otras fuentes de alimento. Los 3 días previos al ensayo se capturaron 61 conejos silvestres. Los conejos se dividieron, en cinco grupos de diez conejos y un sexto grupo, de once conejos, teniendo

en cuenta la fecha de captura y peso del animal para que los lotes fuesen homogéneos. Se administraron 25g trigo a cada conejo, ya fuese medicado o no y una cantidad variable de hierba. En la tabla 8 se reflejan las dosis y cantidades de alimento administrados.

PROTOCOLO DEL ENSAYO 6:

Día 0. Alojamiento de los conejos.

Día 1. Evaluación del consumo de trigo y hierba, retirándose el no consumido. Seguidamente se añadió trigo *ad libitum*.

Día 3. Sacrificio de los animales. Todos los animales fueron sacrificados y las garrapatas recogidas mediante la técnica del cubo de agua anteriormente descrita. Las garrapatas así recogidas se almacenaron en bolsas de plástico con cierre hermético, se rotularon y transportaron al laboratorio.

Grupo	n	Peso/ lote (kg)	Dosis (mg/kg)	Espinosad / Conejo (µl)	Hierba (g)
1	10	11,7	120	250	360
2	10	11,7	60	125	2.400
3	10	11,7	120	250	360
4	10	11,7	60	125	2.400
5	10	11,7	0	0	0
6	11	12,1	115	250	0

Tabla 8. Grupos de conejos silvestres empleados para la determinación de la dosis de espinosad ingerida libremente en presencia de alimento no medicado.

Una vez en el laboratorio, las garrapatas fueron cuantificadas y clasificadas por especie y estadio. La eficacia del tratamiento se evaluó comparando el número de garrapatas recogidas de uno y otro grupo.

4.5.2.3. Ensayos *in vivo* con espinosad en condiciones de campo

Con los resultados de los ensayos en condiciones semicontroladas de campo se pretendió evaluar si en condiciones de completa libertad la dosis de espinosad de 100 mg/kg era también eficaz en el control de la infestación por garrapatas en conejos silvestres. Para ello se planteó el ensayo número 7 en el que se delimitaron 4 zonas, 2 tratadas (Palomas de San Serafín y Camino del Tubo) y 2 controles (Arroyo Silverio y Baltasara) que comprendían cada una 4 comederos para conejos silvestres con sus correspondientes tolvas.

ENSAYO 7: Determinación de la eficacia ixodícida de la dosis de espinosad ingerida libremente por conejos silvestres en completa libertad.

El tratamiento consistió en la colocación de 10 kg de trigo por tolva, tratado o no según la zona. El alimento tratado se preparó mezclando 80 kg de trigo con 800ml de Elector® (384 mg de espinosad; 4,8 mg/kg de trigo). Para facilitar la mezcla del trigo con el producto, éste previamente se diluyó en 7,2l de agua ($7,2\text{ l} + 0,8\text{ l} = 8\text{ l}$). Una vez realizada la mezcla trigo espinosad, esta se extendió y dejó secar a la sombra a temperatura ambiente.

PROTOCOLO DEL ENSAYO 7:

Día -2. Retirada de las tolvas del alimento.

Día 0. Colocación en las tolvas de 10 kg de trigo (tratado o no).

Recuento de garrapatas en tres conejos abatidos en cada zona de estudio.

Día 1 y siguientes. Inspección diaria de las tolvas hasta el consumo total del alimento medicado.

Cuando se consumió la mitad del alimento medicado, se abatieron tres conejos de las zonas tratadas y otros tres conejos de las zonas control.

Cuando se consumió todo el alimento medicado, se contaron las garrapatas que parasitaban cinco animales de cada zona.

La parasitación de los animales se evaluó siguiendo el mismo protocolo de ensayos anteriores.

4.5.2.4. Toxicidad del espinosad

Con la finalidad de observar si había algún efecto nocivo del espinosad en los animales, se tomaron diversas muestras (encéfalo, pulmón, bazo, hígado, estómago, intestino delgado, intestino grueso, linfonodo mesentérico y gónada) a 6 conejos distribuidos de la siguiente manera en los lotes:

- Lote 1: animal 1,1 (240 mg/kg)
- Lote 2: animales 2,1 y 2,2 (120 mg/kg)
- Lote 3: animales 3,1 y 3,2 (60 mg/kg)
- Lote 4: animal 4,1 (control)

Las muestras, se fijaron en formol tamponado al 10% y se procesaron en un inclusor automatizado en el laboratorio de Anatomía Patológica del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA) mediante el protocolo habitual:

1. Etanol 70% durante 90 minutos.
2. Etanol 80% durante 90 minutos.
3. Etanol 96% durante 90 minutos.
4. Etanol 100% durante 60 minutos.
5. Etanol 100% durante 60 minutos.
6. Xilol durante 90 minutos.
7. Xilol durante 90 minutos.

4. 6. ANALISIS ESTADÍSTICOS

Se emplearon los programas SAS, Minitab 15 y OpenStat para la realización de las pruebas estadísticas.

Se empleó la prueba de la normalidad de Ryan-Joiner (similar a Shapiro-Wilk).

Se empleó el test de Bartlett para comprobar si las varianzas son homogéneas.

Se empleó el test no paramétrico de correlación de Spearman cuando las muestras no superaron la prueba de la normalidad, considerándose una correlación baja de 0,1 a 0,3, media de 0,4 a 0,6, alta de 0,7 a 0,9 y absoluta de 1. Distinguiéndose una correlación positiva o directa de una negativa o inversa por el signo del coeficiente, positivo o negativo respectivamente.

También se emplearon los test no paramétricos de Sign, Mann-Whitney y el de Kruskal Wallis cuando las muestras eran demasiado pequeñas o no superaron las pruebas de normalidad y de varianzas homogéneas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. GARRAPATAS EN LA VEGETACIÓN

En los muestreos regulares de vegetación se capturaron un total de 2.664 ejemplares, casi todos adultos, si bien, en una ocasión se recogieron ninfas de *R. bursa*. Las especies identificadas fueron: *Hyalomma lusitanicum* (95,65%), *Dermacentor marginatus* (2,99%), *Rhipicephalus bursa* (0,95%) y *R. pusillus* (0,42%) (Tabla 9). Esta relación de especies coincide con la mencionada en la literatura por Estrada Peña (1994), Cordero del Campillo y col., (1994) y Toledo y col., (2008).

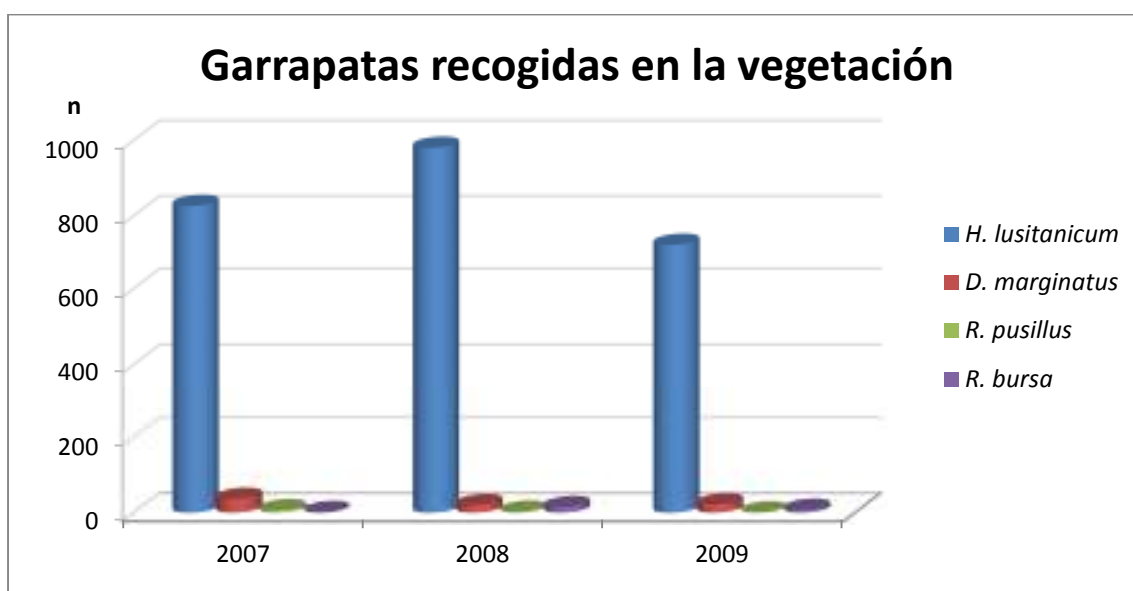
La marcadísima abundancia de *H. lusitanicum* (Gráfica 1) condiciona, como es lógico, el Índice de Abundancia de Garrapatas en los distintos puntos de muestreo (Tabla 10) debido a su propia actividad, como veremos más adelante. Tomando en cuenta la localización geográfica de Ciudad Real, nuestros datos coinciden con lo encontrado en la literatura revisada donde se la menciona como la garrapata más abundante en el centro y sur de la Península Ibérica, representando entre el 80 y 90% de la ixodifauna (Olmeda y col., 2005; Toledo y col., 2009; Barandika y col., 2011).

AÑO	TOTAL	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>Rhipicephalus pusillus</i>	<i>Rhipicephalus bursa</i>
2007	872	826	37	7	2
2008	1.018	980	20	3	15
2009	754	723	22	1	8
Global	2.644	2.529	79	11	25
% TOTAL		95,65	2,99	0,42	0,95

Tabla 9. Garrapatas encontradas en los muestreos de vegetación y porcentaje que representan frente al total de ejemplares capturados durante tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

Al analizar estos datos hay que tener en cuenta el carácter exófilo o endófilo de cada especie y/o estadio. Así, no es difícil recoger de vegetación especies o estadios exófilos, por cuanto permanecen fundamentalmente en

madrigueras, nidos, huecos o grietas. En este sentido, destacó el hecho de que *R. pusillus* pudo ser capturada en la vegetación a pesar del carácter endófilo de todos sus estadios de desarrollo (Sobrinho y col., 2012); así, aun cuando su presencia representó un porcentaje muy pequeño (0,42%), este hallazgo es notable, por las implicaciones epidemiológicas que pudiera tener. Esto explicaría la diferencia entre las especies colectadas de vegetación y las recuperadas sobre los hospedadores. Así mismo, es congruente con nuestros hallazgos, donde en hospedadores se recuperaron los estadios inmaduros además de adultos, mientras que en vegetación solo se capturaron adultos.



Gráfica 1. Garrapatas obtenidas en la vegetación mediante la técnica de arrastre de la bandera durante tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

La presencia de garrapatas en la vegetación estuvo íntimamente relacionada con factores abióticos, entre los que destaca la humedad y la temperatura (Tabla 11). Así, se observó, como era de esperar, una clara relación entre los datos de temperaturas y humedades medidos a nivel de suelo y ambiente, respectivamente, por lo que se consideraron simplemente temperatura y humedad. Los resultados globales mostraron una correlación alta y positiva entre temperatura e IAG y alta pero negativa entre humedad e IAG ($P < 0,001$) (Tabla 12, Gráficas 2 y 3), al igual que para *H. lusitanicum*.

Zonas de muestreo	2007	2008	2009
Punto 1 Olivar	20	59	43
Punto 2 Encinar 1	69	39	33
Punto 3 Eucaliptal 1	18	52	75
Punto 4 Encinar 2	33	45	35
Punto 5 Encinar 3	49	103	54
Puntos 6 Eucaliptal 2	54	79	74

Tabla 10. Índice de Abundancia de Garrapatas en los distintos puntos de muestreo durante los tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

HR ambiente	-0,883		
Valor de P	0,000		
T suelo	0,968	-0,884	
Valor de P	0,000	0,000	
HR Suelo	-0,855	0,978	-0,871
Valor de P	0,000	0,000	0,000

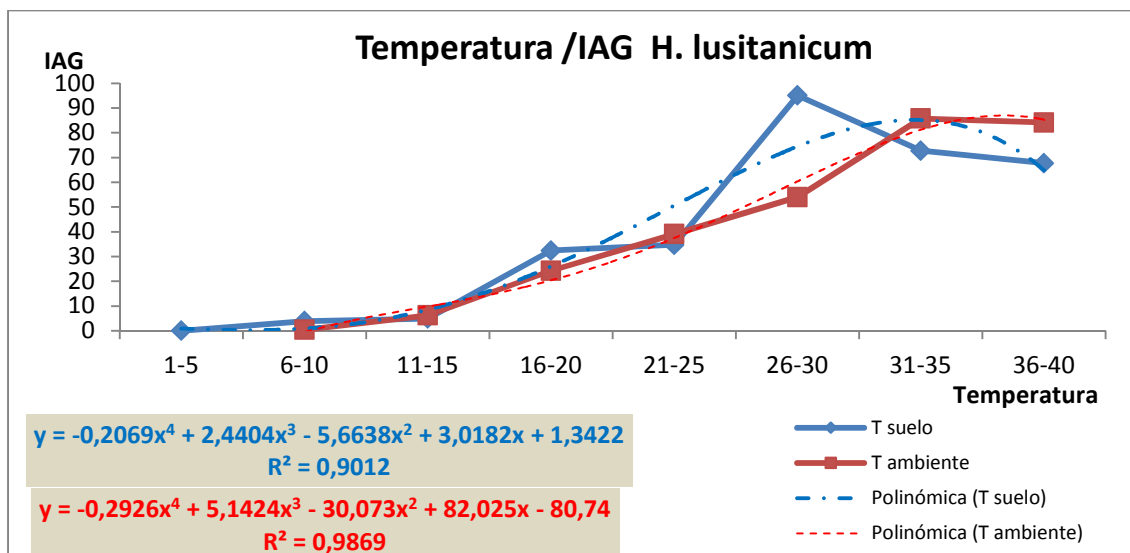
Tabla 11. Correlación entre Temperatura y HR, del suelo y ambientales.

Correlación IAG	Temperatura	Humedad
Humedad	-0,991	
Valor de P	0,000	
IAG	0,927	-0,918
Valor de P	0,000	

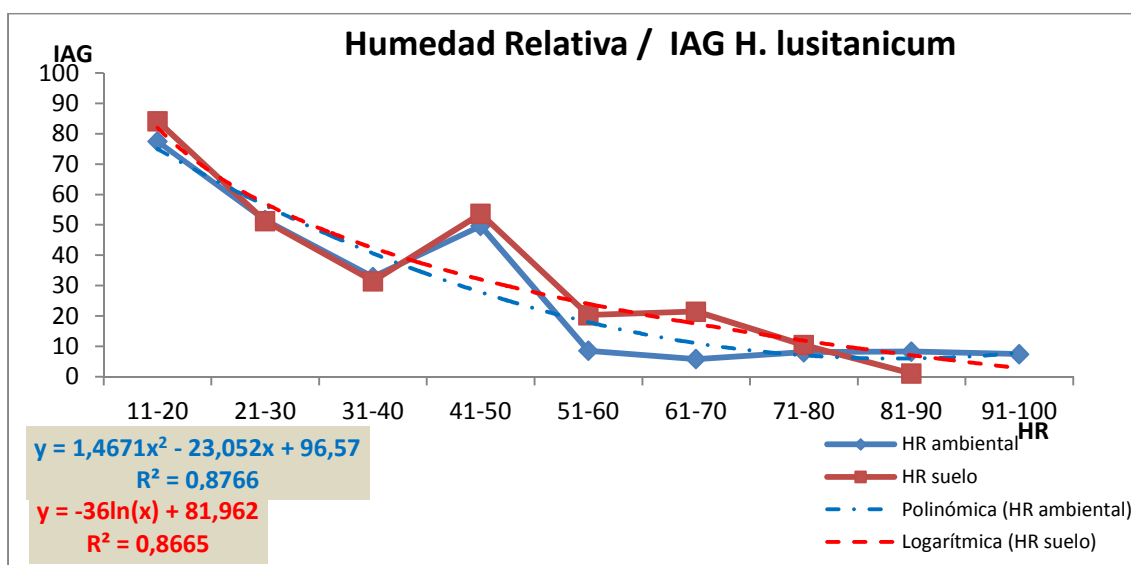
Tabla 12. Correlación entre temperatura y humedad con el Índice de Abundancia de Garrapatas.

IAG por puntos	Humedad	Temperatura
Punto 1	-0,40142	0,68434
Valor de P	0,0421	0,0001
Punto 2	-0,48623	0,64631
Valor de P	0,0101	0,0003
Punto 3	-0,49865	0,64531
Valor de P	0,0081	0,0003
Punto 4	-0,60056	0,70905
Valor de P	0,0009	0,0001
Punto 5	-0,33129	0,47511
Valor de P	0,0914	0,0123
Punto 6	-0,32147	0,46406
Valor de P	0,1020	0,0148

Tabla 13. Correlación entre temperatura y humedad el Índice de Abundancia de Garrapatas en los distintos puntos de muestreo.



Gráfica 2. Relación entre la temperatura (°C) del ambiente y del suelo con el Índice de Abundancia de *Hyalomma lusitanicum* durante los tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.



Gráfica 3. Relación entre la humedad relativa (HR, %) ambiental y del suelo con el Índice de abundancia de *Hyalomma lusitanicum* durante los tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

Según nuestros resultados, al elevarse la temperatura del suelo también aumenta la presencia de garrapatas (IAG) hasta llegar a los 35 °C. A partir de esta temperatura se aprecia un estancamiento. Con la temperatura ambiental se observa un patrón similar, sólo que el crecimiento llega hasta los 30 °C, a partir de los cuales el IAG descende. En ambos casos la

presencia de garrapatas se hace patente a partir de los 6-10°C. El estudio por puntos de muestreo confirmó esta correlación (Tabla 13).

Estos resultados parecen contradecir lo hallado en la literatura científica disponible (Perret y col., 2000; Perret y col., 2003; Gern y col., 2008; Knap y col., 2009; Tagliapietra y col., 2011), donde se menciona que las garrapatas se encuentran más activas cuando la humedad relativa es mayor y la temperatura menor. En efecto, es notoria la sensibilidad de las garrapatas a la desecación, sin embargo estas observaciones generalmente se refieren a especies de garrapatas exófilas adaptadas a climas más húmedos, principalmente *Ixodes* spp. y *Dermacentor* spp. Sin embargo, en ecosistemas mesomediterráneos, donde los suelos son áridos, las garrapatas han conseguido adaptarse y sobrevivir a condiciones letales para otras especies. Entre otras estrategias, complementan el comportamiento de acecho al hospedador encaramadas en la vegetación con el órgano de Haller expuesto al aire, por una búsqueda activa dirigida por su visión, más desarrollada que en otras garrapatas, cuando perciben la presencia de un hospedador abandonando entonces el refugio bajo la hojarasca o las grietas del suelo donde se protegen de las condiciones climáticas adversas (Harwood y James, 1993; Jongejan y Uilenberg, 2004). Así pues, teniendo en cuenta el clima mediterráneo de la Península Ibérica, con veranos cálidos y muy secos, *H. lusitanicum* se hace extremadamente abundante precisamente cuando la humedad relativa es baja y la temperatura alta.

Además de la humedad y la temperatura, otro factor abiótico determinante de la presencia y abundancia de garrapatas es la altitud. De acuerdo a las observaciones publicadas por otros autores, que han estudiado la fenología de especies distintas, éste es uno de los principales factores determinantes, ya que aun cuando las diferencias de humedad y temperatura eran variables, no se producían modificaciones significativas en la abundancia de garrapatas si las zonas se encontraban a altitudes semejantes (Gern y col., 2009). De igual manera nuestros resultados en los distintos puntos de muestreo no presentaron diferencias significativas, por cuanto las altitudes eran semejantes, a pesar de las diferentes condiciones bióticas en

eucaliptal, olivar o encinar. Así, el promedio anual del Índice de Abundancia de Garrapatas (IAG) en los diversos puntos de muestreo osciló entre 18 y 103 (Tabla 10). En 2007 el máximo IAG se encontró en el punto 2 (encinar 1), en 2008 en el punto 5 (encinar 3) y en 2009 en los puntos 3 y 6 (eucaliptales 1 y 2). Aunque estos datos no siguieron una distribución normal, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los distintos puntos de muestreo ($P=0,56$) lo que nos permitió emplear este índice mensual para establecer la dinámica estacional anual, pudiendo estar relacionado con la altitud (Gern y col., 2008; Knap y col., 2009).

En consecuencia, parece clara la relación entre temperatura y humedad con la presencia de *H. lusitanicum*, cuya abundancia constituye un grave problema en la zona debido a las molestias que ocasiona a los animales, a su capacidad vectorial (Viseras y col., 1999) y a su posible importancia en Salud Pública, al mantener agentes zoonóticos bacterianos en el medio (Toledo, 2009).

5.2. GARRAPATAS EN LOS HOSPEDADORES

Durante los tres años de estudio se examinaron un total de 180 animales: 30 ciervos, 31 jabalíes y 119 conejos, obteniéndose un total de 9.401 garrapatas.

El número de especies de garrapatas identificadas en animales fue mayor que en vegetación, ya que se encontraron además *Haemaphysalis hispanica*, *Ixodes ricinus* e *Ixodes ventralloi*, coincidiendo de nuevo con las observaciones de otros autores (Olmeda y col., 2005, Toledo y col., 2009; Barandika y col., 2011; Sobrino y col., 2012).

La diferencia entre el número de especies de ixódidos recolectados de la vegetación y los recuperados sobre los hospedadores es debido a que hay garrapatas endófilas que difícilmente se encuentran en suelo. Algunas se comportan de distinta manera según el estadio, a modo de ejemplo, los adultos y las larvas de *Hyalomma*, *Rhipicephalus* y *Dermacentor* son exófilos, mientras que las ninfas son endófilas (Sobrino y col., 2012). Esto explicaría que en los hospedadores se recuperaran tanto estadios

inmaduros como adultos, mientras que en vegetación prácticamente solo se capturaran adultos.

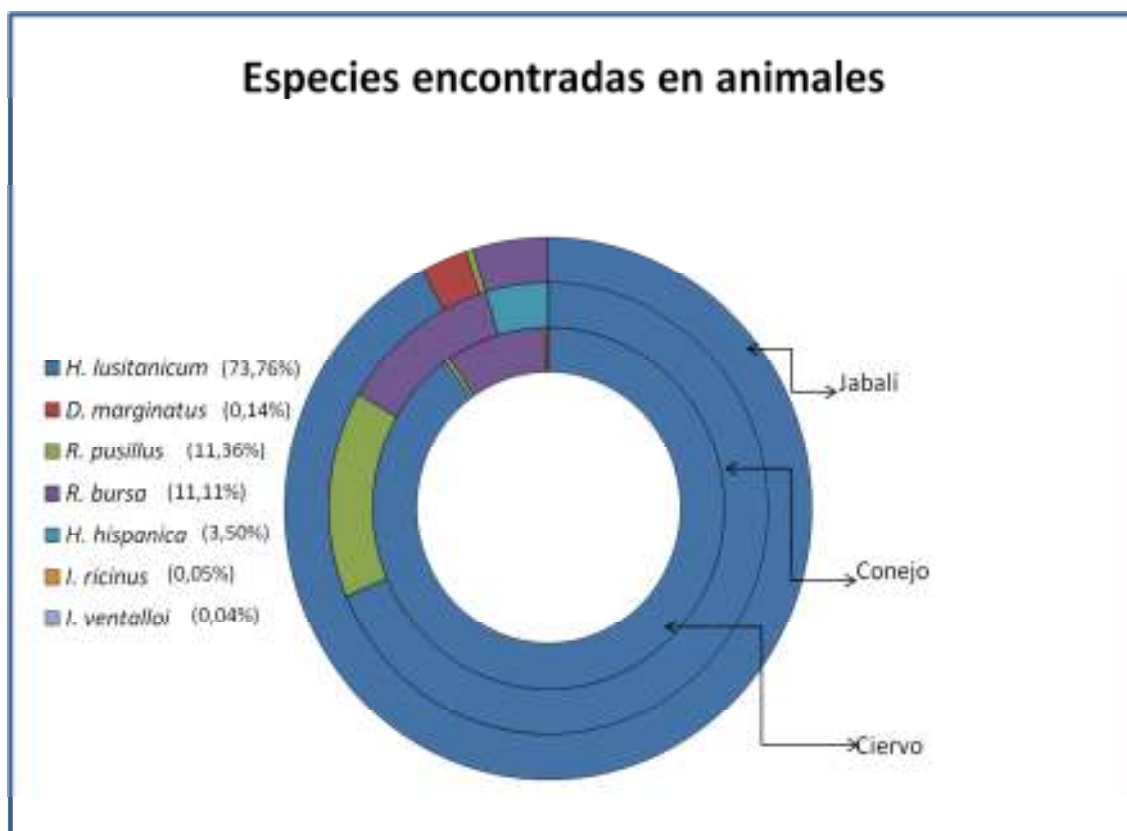


Figura 17. Especies de garrapatas recogidas en cada hospedador.

De forma similar a los hallazgos en vegetación, se pudo corroborar que la especie más abundante fue *H. lusitanicum* (73,76%, encontrada en ciervo, conejo y jabalí), seguida de *R. pusillus* (11,36%, encontrada en ciervo, conejo y jabalí), *R. bursa* (11,11%, encontrada en ciervo, conejo y jabalí), *Haemaphysalis hispanica* (3,5%, encontrada en conejos), *D. marginatus* (0,14 %, conejo y jabalí), *Ixodes ricinus* (0,05%, encontrada en ciervo) e *Ixodes ventralloi* (0,04 %, encontrada en ciervo y conejo) (Figura 17, Tabla 14).

En relación a los estadios de desarrollo, en ciervos se encontraron principalmente adultos, pero también ninfas y, en el mes de julio, coincidiendo con el mayor nivel de adultos en vegetación, se encontraron los tres estadios alimentándose simultáneamente (Figura 18, Tabla 15). En

general, el mayor porcentaje de inmaduros se recogió de conejos, si bien también se encontraron adultos de ciertas especies que completan su ciclo en este hospedador, como *R. pusillus* y *H. hispanica* y esporádicamente, algún *H. lusitanicum* (Figura 19, Tabla 16). En jabalíes solo se encontraron adultos (Figura 20, Tabla 17).

	Ciervo (n= 30) Nº de garrapatas IP Max	Conejo (n=119) Nº de garrapatas IP Max	Jabalí (n=31) Nº de garrapatas IP Max	Total (n=180) Nº de garrapatas IP Max
<i>H. lusitanicum</i>	1.592 53,1 245	4.923 41,4 342	420 13,6 105	6.935 38,5 342
<i>D. marginatus</i>	0 0 0	1 0 1	13 0,4 9	14 0,1 9
<i>R. pusillus</i>	8 0,3 2	1.058 8,9 238	2 0,1 1	1.068 5,9 238
<i>R. bursa</i>	162 5,4 43	862 7,2 268	21 0,7 7	1.045 5,8 268
<i>H. hispanica</i>	0 0 0	330 2,8 35	0 0 0	330 1,8 35
<i>I. ricinus</i>	5 0,2 3	0 0 0	0 0 0	5 0 3
<i>I. ventalloi</i>	2 0,1 2	2 0 1	0 0 0	4 0 2
Total	1.769 59,0 254	7.176 60,3 580	456 14,7 105	9.401 52,2 580

Tabla 14. Índice de Parasitación (IP) de las especies de garrapatas encontradas en los tres tipos de hospedadores estudiados durante años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

El mayor índice de parasitación (IP) lo presentaron los conejos (60,3) y ciervos (59,0), seguidos de lejos por los jabalíes (14,7). El animal más parasitado fue un conejo con 580 garrapatas. Analizando el IP por especie de garrapata y hospedador, el mayor IP de *H. lusitanicum* lo presentaron los ciervos (53,1) seguidos de los conejos (41,4) y jabalíes (13,6). *Rhipicephalus* spp. fue el segundo género con mayor IP, con *R. pusillus* en conejo (8,9) y *R. bursa* en conejo y ciervo (7,2 y 5,4, respectivamente).

Fueron minoritarias las parasitaciones por el resto de especies: *H. hispanica*, en conejo (2,8); *D. marginatus* en jabalí (0,4), e *I. ricinus* e *I. ventalloi* en ciervo (0,2 y 0,1, respectivamente) (Tabla 14).

El IP varió a lo largo del año, iniciándose el año con niveles muy bajos en todas las especies y aumentando progresivamente en primavera hasta alcanzar los máximos índices en los meses estivales en conejo y ciervo. Los resultados en jabalí mostraron bajo IP en general, con los mayores valores en la primavera. Para tener una visión más clara del papel que juega cada uno de estos animales es necesario analizar sus datos separadamente.

5.2.1. ÍNDICE DE PARASITACIÓN DEL CIERVO

La distribución estacional de las especies de garrapata en el ciervo indicó que en este hospedador se pueden encontrar ejemplares de *H. lusitanicum* durante todo el año, especialmente de febrero a septiembre (Gráfica 4, Tabla 15). En este hospedador se encontraron además *R. bursa*, *R. pusillus*, *I. ventalloi* e *I. ricinus*, siendo las dos primeras las más comunes después de *H. lusitanicum* (Figura 18).



Figura 18. Dinámica estacional en ciervos, incluyendo todas las especies de garrapatas encontradas, y todos los estadios. L= larva, N= ninfa y A= adulto.

Tan sólo se identificaron todos los estadios sobre este hospedador en *H. lusitanicum*. Los adultos se encontraron prácticamente en cualquier época del año; las ninfas se detectaron en los meses más calurosos y, ocasionalmente en marzo y noviembre; finalmente, las larvas sólo se detectaron en julio.

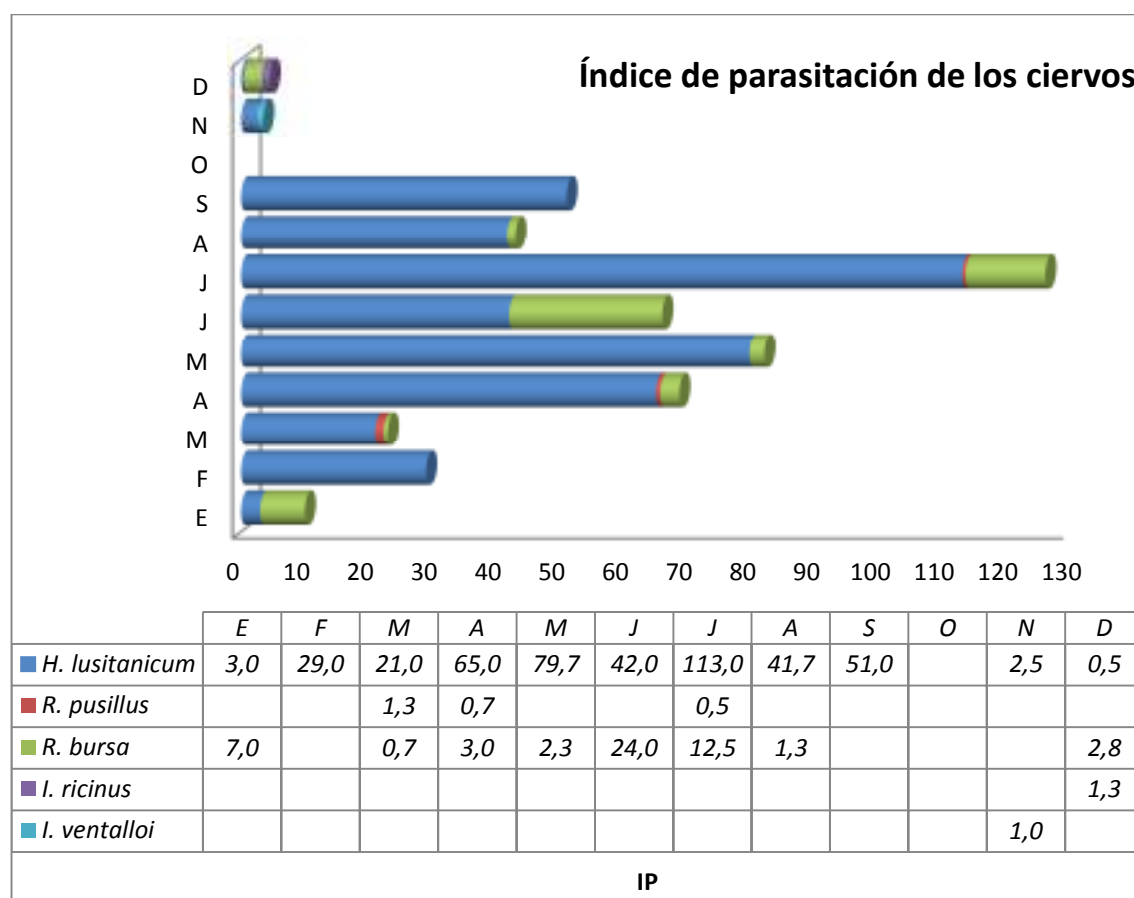
En cuanto a *R. bursa* también observamos adultos y ninfas parasitando simultáneamente, aunque los adultos se observaron principalmente en los meses cálidos, de abril a agosto, y las ninfas en los meses fríos, entre diciembre y marzo. *R. pusillus*, se detectó muy esporádicamente, por cuanto su hospedador habitual es el conejo.

IP	<i>H. lusitanicum</i> A-N-L	<i>R. pusillus</i> A-N-L	<i>R. bursa</i> A-N-L	<i>I. ricinus</i> A-N-L	<i>I. ventralloi</i> A-N-L	Ciervos n
Enero	3-0-0	0-0-0	0-7-0	0-0-0	0-0-0	1
Febrero	29-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	1
Marzo	20-1-0	1-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	3
Abril	65-0-0	1-0-0	3-0-0	0-0-0	0-0-0	3
Mayo	80-0-0	0-0-0	2-0-0	0-0-0	0-0-0	3
Junio	41-1-0	0-0-0	24-0-0	0-0-0	0-0-0	3
Julio	88-14-11	1-0-0	12-1-0	0-0-0	0-0-0	4
Agosto	37-4-0	0-0-0	1-0-0	0-0-0	0-0-0	3
Septiembre	41-10-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	3
Octubre	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	1
Noviembre	0-5-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	2-0-0	1
Diciembre	1-0-0	0-0-0	0-3-0	1-0-0	0-0-0	4

Tabla 15. Presencia de los distintos estadios de las garrapatas en ciervos y por mes. A= adulto; N= ninfa; L= larva. n= número de animales.

I. ricinus sólo se detectó en ciervos durante el mes de enero, y sólo en su estadio adulto. Al analizar este hecho hay que tener en cuenta que aunque los ciervos se capturaban en la zona de clima mesomediterráneo tenían libre acceso a toda la finca, incluido el área de montaña, donde se mantienen las condiciones para el mantenimiento de *I. ricinus* (Gern y col., 2008; Knap y col., 2009; Barandika y col., 2010; Tagliapietra y col., 2011) y donde posiblemente los animales adquirieran la infestación. Al contrario de lo que ocurre en el norte de España, donde *I. ricinus* es la especie más

abundante en ungulados silvestres (Estrada Peña, 2004; Vázquez y col., 2011), su presencia en nuestro área de estudio es testimonial. Sin embargo, el hallazgo es importante por el interés de esta especie en Salud Pública, al ser transmisora de numerosos patógenos a los seres humanos (Estrada Peña, 2004; Tagliapietra, 2012; Sobrino y col., 2012). Finalmente, la presencia de *I. ventalloi*, fue también testimonial y solo se encontraron dos adultos en el mes de noviembre (Figura 18, Tabla 15).



Gráfica 4. Índice de parasitación mensual por las diversas especies de garrapatas en los ciervos estudiados durante tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

5.2.2. ÍNDICE DE PARASITACIÓN DEL CONEJO

El conejo presentó su máximo IP en julio (Gráfica 5), coincidiendo con lo observado en los venados. En este lagomorfo se identificaron seis de las siete especies de garrapatas localizadas en este área: *H. lusitanicum*, *H. hispanica*, *R. bursa*, *R. pusillus*, *I. ventalloi* y *D. marginatus*, siendo frecuente

encontrar en el mismo animal los tres estadios de desarrollo en cuatro especies: *H. lusitanicum*, *H. hispanica*, *R. bursa*, *R. pusillus* (Figura 19, Tabla 16).

De nuevo *H. lusitanicum* fue la especie mayoritaria (42% del total) siendo los principales estadios recogidos de este hospedador larvas y ninfas y en menor medida adultos por lo que la parasitación por éstos puede considerarse como accidental. Esta especie fue observada casi todo el año, empezando en el mes de marzo y finalizando en octubre.

La siguiente garrapata en abundancia fue *R. pusillus*, como corresponde a una especie específica de este hospedador en clima mesomediterráneo. Es una garrapata endófila en todo su ciclo, que se encontró, principalmente en sus estadios inmaduros, en los meses de julio y agosto, aunque estuvo presente de febrero a octubre. Su ausencia durante los meses más fríos se asocia a factores climáticos. Un dato importante es que los adultos de *R. pusillus* aparecieron durante casi todo el año en estos hospedadores.

Las otras especies de garrapatas presentaron menores IP, como *R. bursa* cuyo principal hospedador no son los conejos y que estuvo presente de mayo a septiembre, especialmente de julio a septiembre, coincidiendo con la mayor presencia de larvas y ninfas.

La cuarta especie más abundante en los conejos de la zona fue *H. hispanica*, presente en este hospedador en su fase adulta de febrero a septiembre, y de forma residual en noviembre. Los estadios inmaduros de *H. hispanica* fueron identificados en los meses más calurosos, de julio a septiembre. Estos resultados coinciden con los descritos por Rodríguez Rodríguez (1981) en la provincia de Ciudad Real.

Finalmente, *I. ventalloi* y *D. marginatus* se encontraron esporádicamente en este hospedador, ambas durante la temporada de otoño (octubre).

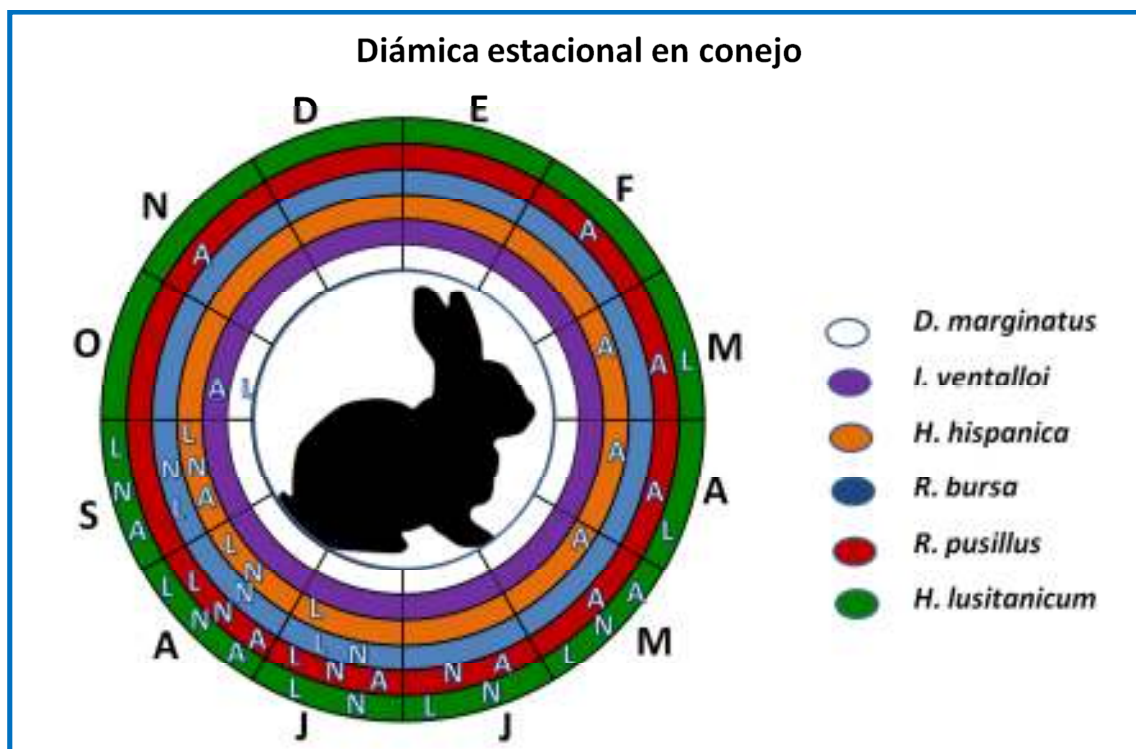
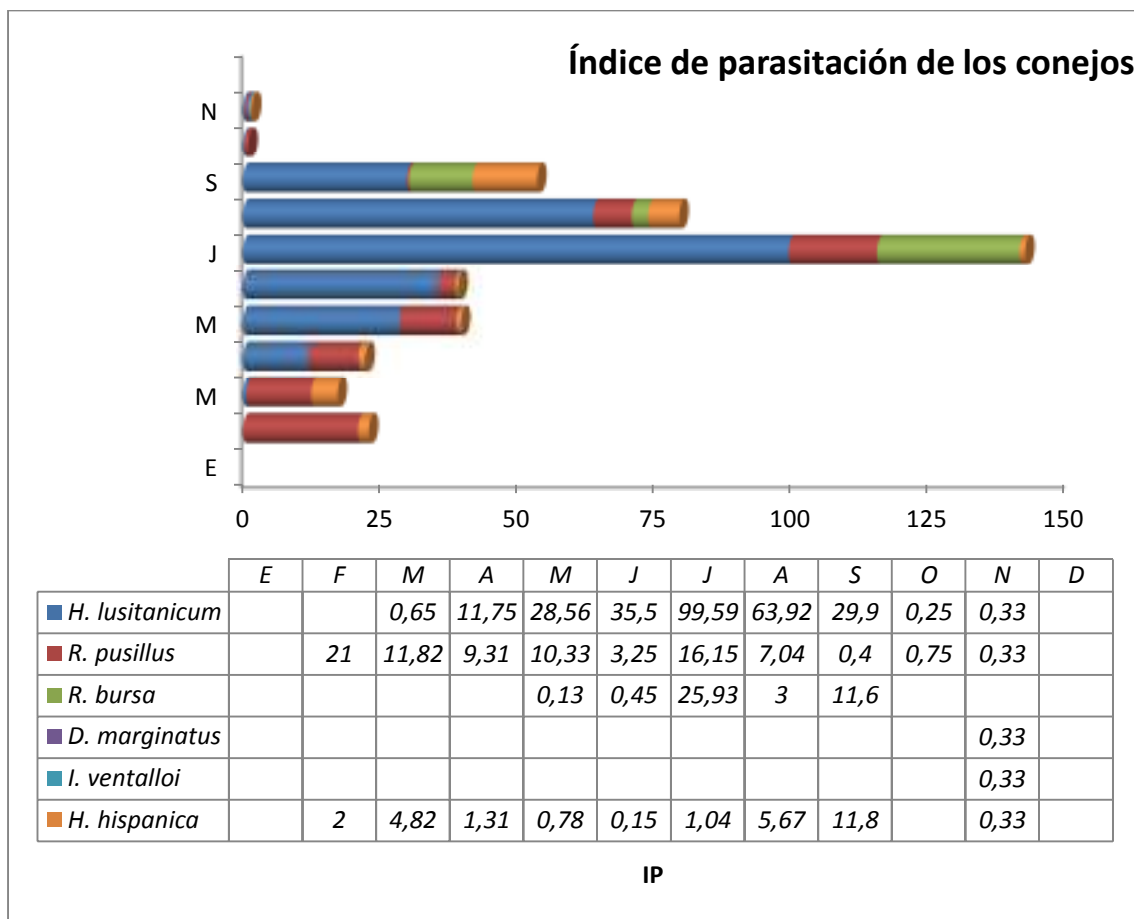


Figura 19. Dinámica estacional en conejos, incluye todas las especies de garrapatas encontradas y todos los estadios. L= larva, N= ninfa y A= adulto.

IP	<i>H. lusitanicum</i> A-N-L	<i>R. pusillus</i> A-N-L	<i>R. bursa</i> A-N-L	<i>H. hispanica</i> A-N-L	<i>I. v</i> A-N-L	<i>D.m</i> A-N-L	Conejos n
Enero	-	-	-	-	-	-	-
Febrero	0-0-0	21-0-0	0-0-0	2-0-0	-	-	1
Marzo	0-0-1	12-0-0	0-0-0	4-0-0	-	-	17
Abril	0-0-12	9-0-0	0-0-0	1-0-0	-	-	16
Mayo	1-21-6	10-0-0	0-0-0	1-0-0	-	-	9
Junio	0-19-17	2-1-0	0-0-0	0-0-0	-	-	20
Julio	0-33-66	1-4-10	0-6-20	0-0-3	-	-	27
Agosto	4-48-12	3-4-1	0-3-0	0-3-2	-	-	12
Septiembre	6-14-10	0-0-0	0-2-9	1-8-2	-	-	10
Octubre	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	1-0-0	0-0-1	6
Noviembre	0-0-0	1-0-0	0-0-0	0-0-0	-	-	1
Diciembre	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 16. Presencia de los distintos estadios de las garrapatas en conejos y por mes. A= adulto; N= ninfa; L= larva. n= número de animales. I.v= *Ixodes ventralloi*; D.m= *D. marginatus*



Gráfica 5. Índice de parasitación mensual por las diversas especies de garrapatas en los conejos estudiados durante tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

5.2.3. ÍNDICE DE PARASITACIÓN DEL JABALÍ

Al analizar la parasitación de los jabalíes, es necesario tener en cuenta que estos tienen limitado el acceso a la llanura, mientras que los conejos y ciervos pueden circular libremente por toda la zona de estudio, salvo el olivar ecológico. Este puede ser uno de los motivos de que el IP de los jabalíes fuera menor y de que sólo se encontraran cuatro especies de garrapatas, a saber, *H. lusitanicum*, *D. marginatus*, *R. pusillus* y *R. bursa*.

Al igual que en los casos anteriores, la especie más abundante fue *H. lusitanicum* (Gráfica 6, Figura 20, Tabla 17). Sólo se identificaron adultos en esta especie (se detectó la presencia de una larva en un animal muestreado en septiembre), si bien pudiera ser debido a la mayor dificultad de la recogida en esta especie animal, por las características de su pelaje.

El jabalí no se cita expresamente como hospedador de *Hyalomma lusitanicum*, en el Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos, en el que solo se mencionan ungulados, lagomorfos, perros y lirón careto. Sin embargo, Apanaskevich y col., (2008), la mencionan en cerdo y jabalí, y de éste último, como en nuestro caso, fue recolectada únicamente en su estadio adulto. En nuestro estudio, el mayor IP por esta especie tuvo lugar en abril, disminuyendo gradualmente hasta junio, un dato distinto al del resto de hospedadores estudiados. Un posible motivo, podría ser el comportamiento preventivo de la infestación que desarrollan los jabalíes revolcándose en barro.

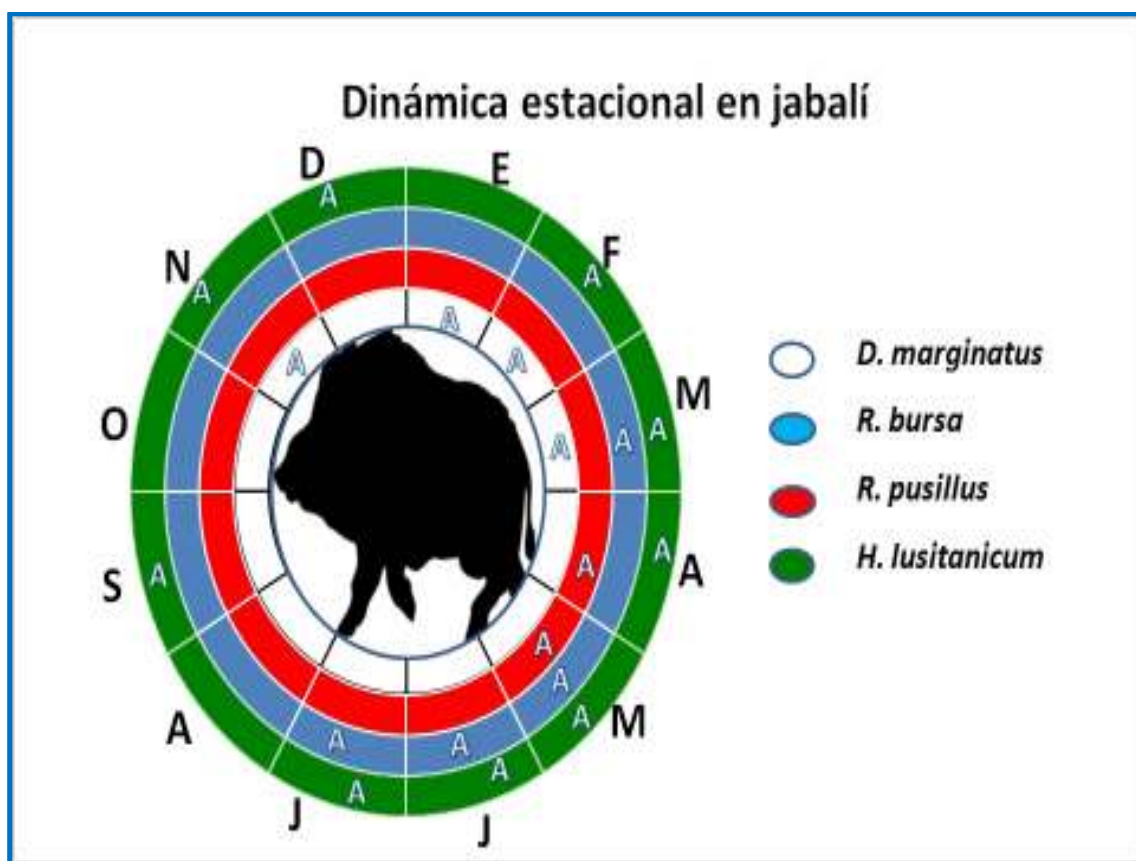


Figura 20. Dinámica estacional en jabalíes, incluyendo todas las especies encontradas y todos los estadios. L= larva, N= ninfa y A= adulto.

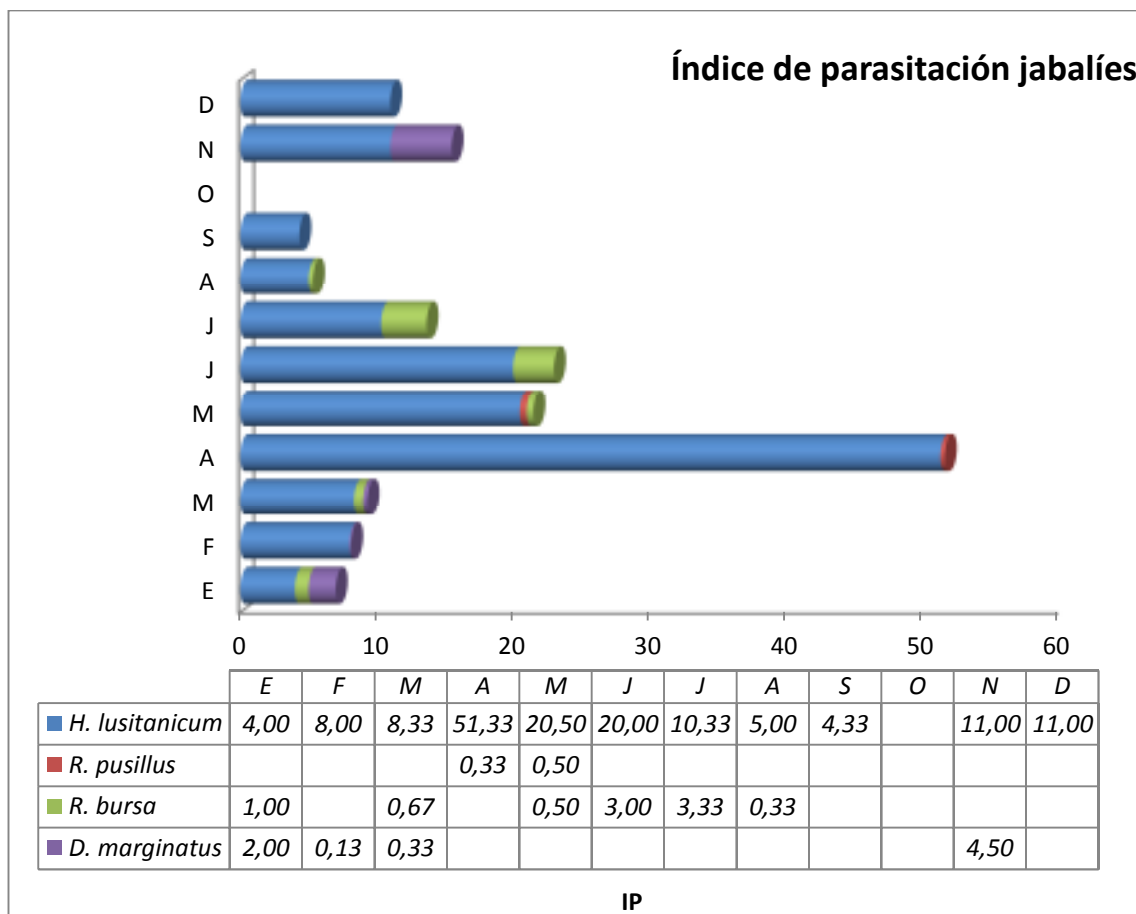
La siguiente garrapata más abundante en jabalíes fue *D. marginatus*. Igualmente, al cotejar la información recabada durante los muestreos en animales con el Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos (Cordero del Campillo, 1994), pudimos observar que la garrapata *Dermacentor marginatus*, se menciona en dicho catálogo como parasita de lagomorfos,

ungulados, micromamíferos y perros pero no se la menciona parasitando jabalíes. Sin embargo, en 2004, de la Fuente y colaboradores también la identificaron en este suido en el centro de España.

Las otras dos especies de garrapatas localizadas en los jabalíes fueron *R. pusillus* y *R. bursa*, ambas solo en su estadio adulto y su presencia fue anecdótica. *R. bursa* apareció en enero, marzo y de mayo a agosto con la mayor incidencia en junio y julio; mientras que *R. pusillus* sólo apareció en abril y mayo.

IP	<i>H. lusitanicum</i> A-N-L	<i>D. marginatus</i> A-N-L	<i>R. pusillus</i> A-N-L	<i>R. bursa</i> A-N-L	jabalíes n
Enero	4-0-0	2-0-0	0-0-0	0-1-0	1
Febrero	4-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	8
Marzo	8-0-0	0-0-0	0-0-0	1-0-0	3
Abril	51-0-0	0-0-0	1-0-0	0-0-0	3
Mayo	21-0-0	0-0-0	2-0-0	1-0-0	2
Junio	20-0-0	0-0-0	0-0-0	3-0-0	2
Julio	10-0-0	0-0-0	0-0-0	2-1-0	3
Agosto	5-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	3
Septiembre	4-0-1	0-0-0	0-0-0	0-0-0	3
Octubre	-	-	-	-	-
Noviembre	11-0-0	5-0-0	0-0-0	0-0-0	2
Diciembre	11-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	1

Tabla 17. Presencia de los distintos estadios de las garrapatas en jabalíes y por mes. A= adulto; N= ninfa; L= larva. n= número de animales.



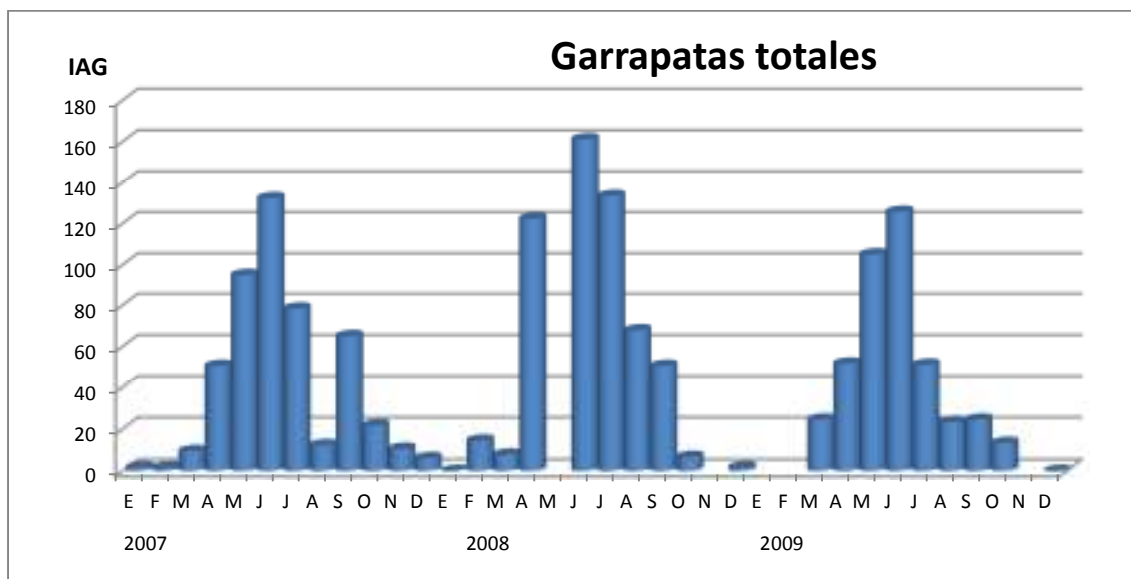
Gráfica 6. Índice de parasitación mensual por las diversas especies de garrapatas en los jabalíes estudiados durante tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

5.3. FENOLOGÍA DE LAS GARRAPATAS ENCONTRADAS

En conclusión podemos decir que en la zona de estudio se localizan al menos siete especies de garrapatas. El IAG global muestra un patrón característico, iniciándose el año con muy poca presencia de garrapatas en la vegetación y a partir de marzo hay un incremento progresivo hasta el mes de junio, descendiendo luego progresivamente hasta volver a niveles mínimos a finales de año (Gráfica 7). Cuatro de las especies detectadas se pudieron observar tanto en la vegetación como sobre los animales, mientras que las tres restantes se encontraron solamente en animales.

Los datos obtenidos de la especie más abundante, *H. lusitanicum*, nos han permitido avanzar bastante en el conocimiento de su fenología, y serán tratados en un apartado específico por cuanto fueron el punto de partida de los estudios de control. En cuanto al resto de especies, debido al pequeño

número de ejemplares recolectados, no es posible establecer completamente su fenología, si bien se ha obtenido valiosa información al respecto. A continuación se trata brevemente cada una de ellas.

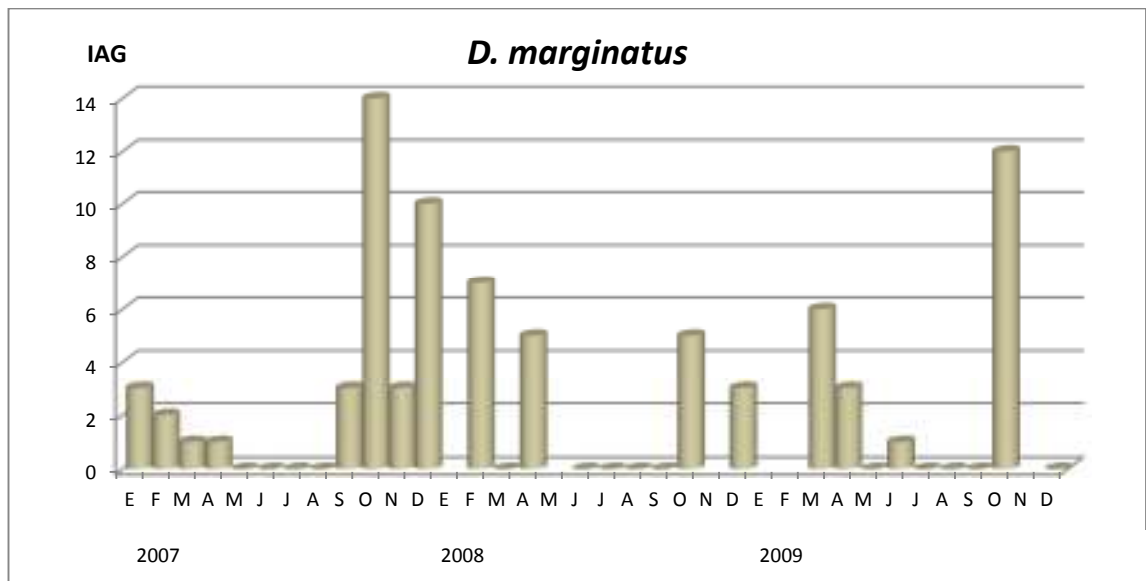


Gráfica 7. Índice de abundancia de garrapatas (IAG) en la vegetación durante los tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

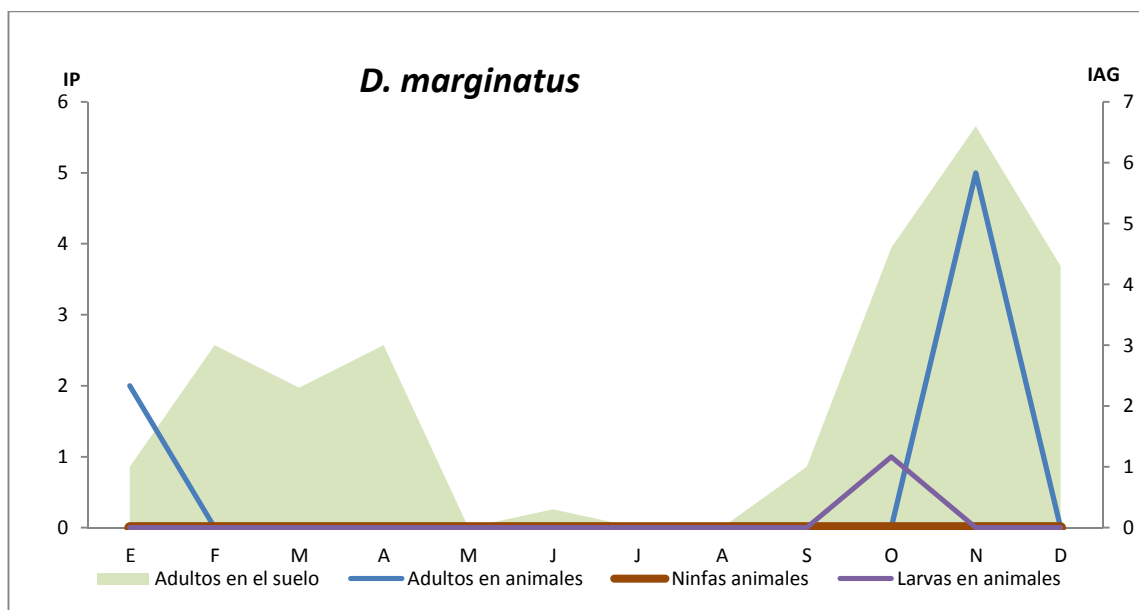
5.3.1. Fenología de *Dermacentor marginatus*

Esta garrapata fue la segunda más abundante, lo que coincide nuevamente con las observaciones de Toledo (2009) y Barandika y colaboradores (2011). Como corresponde a la especie, presentó una actividad más invernal que el resto de garrapatas (de octubre a abril) permaneciendo prácticamente inactiva en los meses cálidos.

Los adultos en vegetación aparecieron entre septiembre y abril con máximos en octubre (Gráfica 8), alimentándose en animales entre octubre y febrero (Gráfica 9), fundamentalmente en jabalí. Los estadios inmaduros no se encontraron en el suelo debido a su naturaleza endófila, pero se alimentaron como larvas en octubre principalmente en conejo.



Gráfica 8. Índice de abundancia de *D. marginatus* (IAG) en la vegetación durante los tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

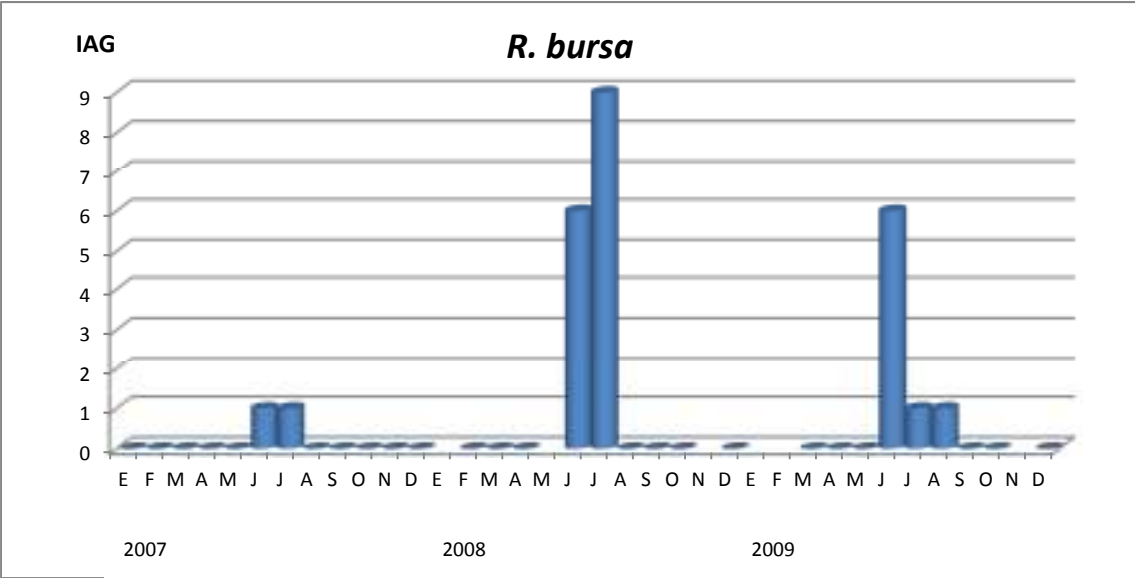


Gráfica 9. Fenología de *D. marginatus* durante los tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

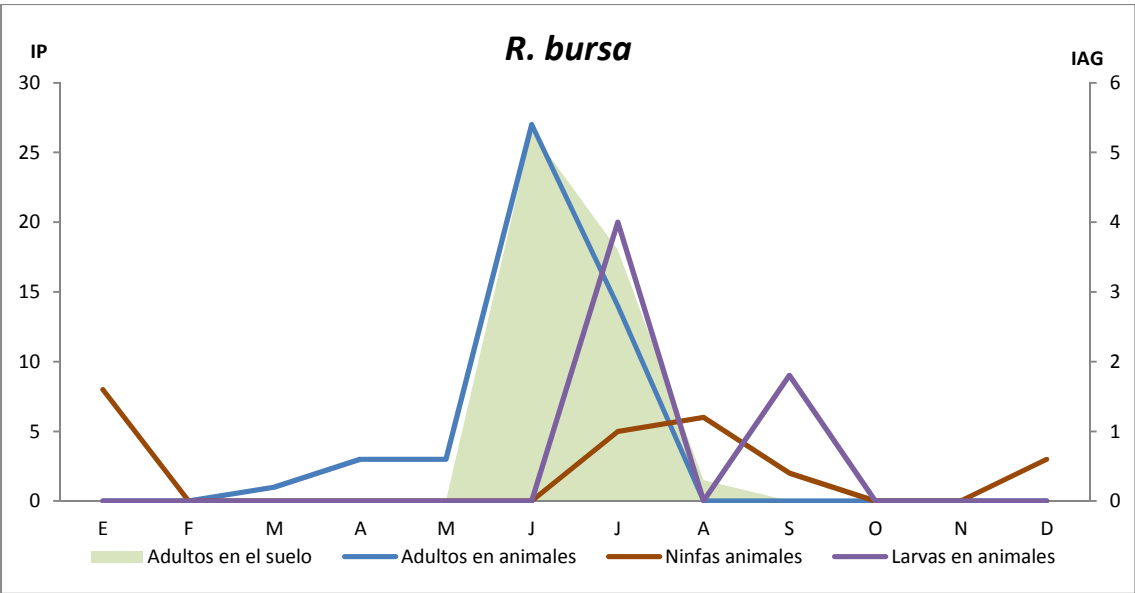
5.3.2. Fenología de *Rhipicephalus bursa*

Con base a los datos obtenidos durante estos tres años de muestreo se puede afirmar que *R. bursa* presenta en la zona de estudio una actividad preferentemente estival (entre junio y agosto), lo cual puede verse en la

Gráfica 10, donde se muestran los ejemplares recogidos de vegetación. Los primeros adultos se localizan en animales en mayo, cuando la temperatura ambiental empieza a subir, y para junio pueden verse larvas y ninfas alimentándose en diferentes hospedadores.



Gráfica 10. Índice de abundancia de *R. bursa* (IAG) en la vegetación durante los tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.



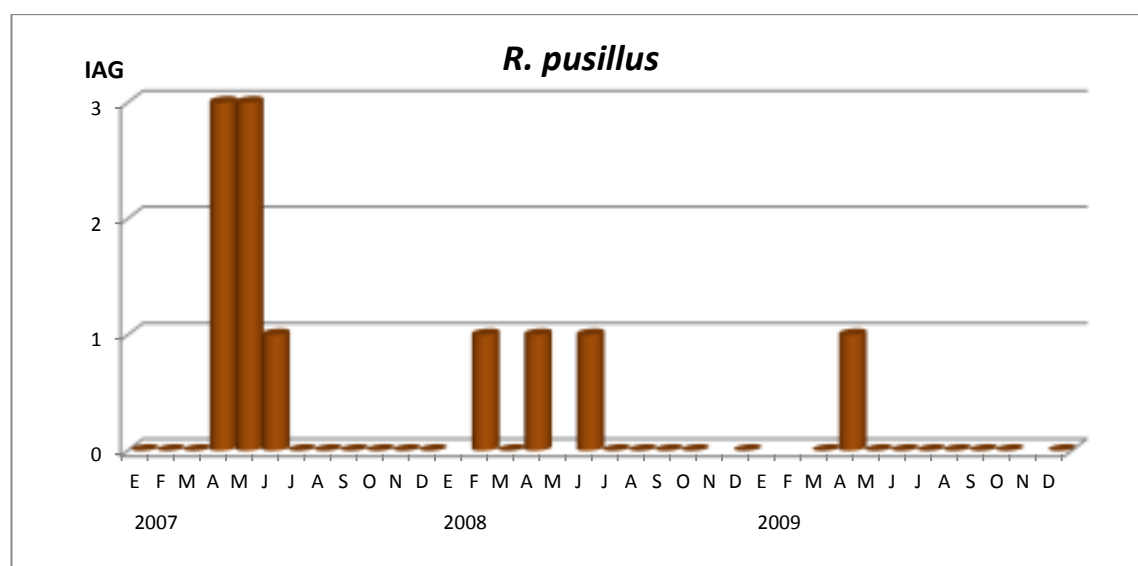
Gráfica 11. Fenología de *R. bursa* durante los tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

Así pues, los adultos y ninfas se encuentran en los tres hospedadores, mostrando su mayor presencia sobre los animales en el mes de junio, mientras que las larvas se alimentan exclusivamente conejos, presentado su mayor actividad durante julio y septiembre (Gráfica 11). No se encontraron adultos en conejos. Esta garrapata, fue con *H. lusitanicum* la única que se encontró sobre las tres especies de hospedadores.

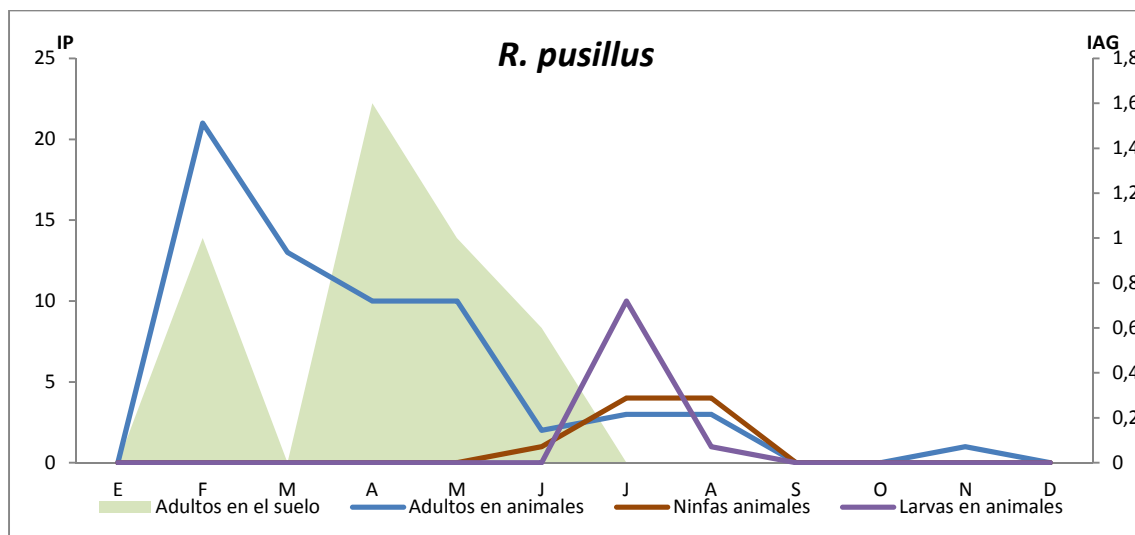
5.3.3. Fenología de *Rhipicephalus pusillus*

Que *R. pusillus* no se encontrara en abundancia en la vegetación concuerda con el hecho de que es una especie endófila en todos sus estadios. Aun así, algunos adultos fueron recogidos entre febrero y junio (Gráfica 12).

En cuanto a las fases parásitas, los adultos se encontraron principalmente en conejos y muy puntualmente en ciervo y jabalí, con un máximo en febrero descendiendo paulatinamente hasta septiembre. En julio se produjo la alimentación de larvas y algo más retrasadas las ninfas entre julio y agosto (Gráfica 13).



Gráfica 12. Índice de abundancia de *R. pusillus* (IAG) en la vegetación durante los tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.



Gráfica 13. Fenología de *R. pusillus* durante los tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

5.3.4. Fenología de *Ixodes ricinus*

Debido a su importancia en Salud Pública (Estrada Peña, 2004; Tagliapietra, 2012; Sobrino y col., 2012; entre otros), es necesario citar, aunque su presencia fuera testimonial a *I. ricinus* que tan sólo fue identificada en su estadio adulto y en un ciervo durante el mes de enero.

Los requerimientos de temperatura y humedad de esta especie (Gern y col., 2008; Knap y col., 2009; Barandika y col., 2010; Tagliapietra y col., 2011) limitan su presencia en España a la zona norte, donde es la especie más abundante en ungulados silvestres (*Capreolus capreolus*) a los que parasitan en todos sus estadios y también es la más frecuentemente recogida de la vegetación durante prácticamente todo el año (Estrada-Peña, 2004; Vázquez y col., 2011).

En nuestro caso, sólo los ciervos que tienen libre acceso a la zona de montaña, donde se mantienen las condiciones adecuadas para esta especie, son parasitados por *I. ricinus*, y en muy escasa proporción.

5.3.5. Fenología de *Ixodes ventalloi*

Esta especie sólo se localizó en ciervos y conejos y en su fase adulta, y nunca en vegetación de forma congruente con la literatura publicada, ya que se considera endófila en todo su ciclo (Cordero del Campillo 1994).

5.3.6. Fenología de *Hyalomma lusitanicum*

La fenología de esta especie requiere un tratamiento específico, pues a la vista de los resultados generales se concluye que es precisamente esta garrapata la que debe ser objeto de un plan integrado de control, siendo el punto de partida del resto de esta memoria.

5.3.6.1. *H. lusitanicum* en la vegetación

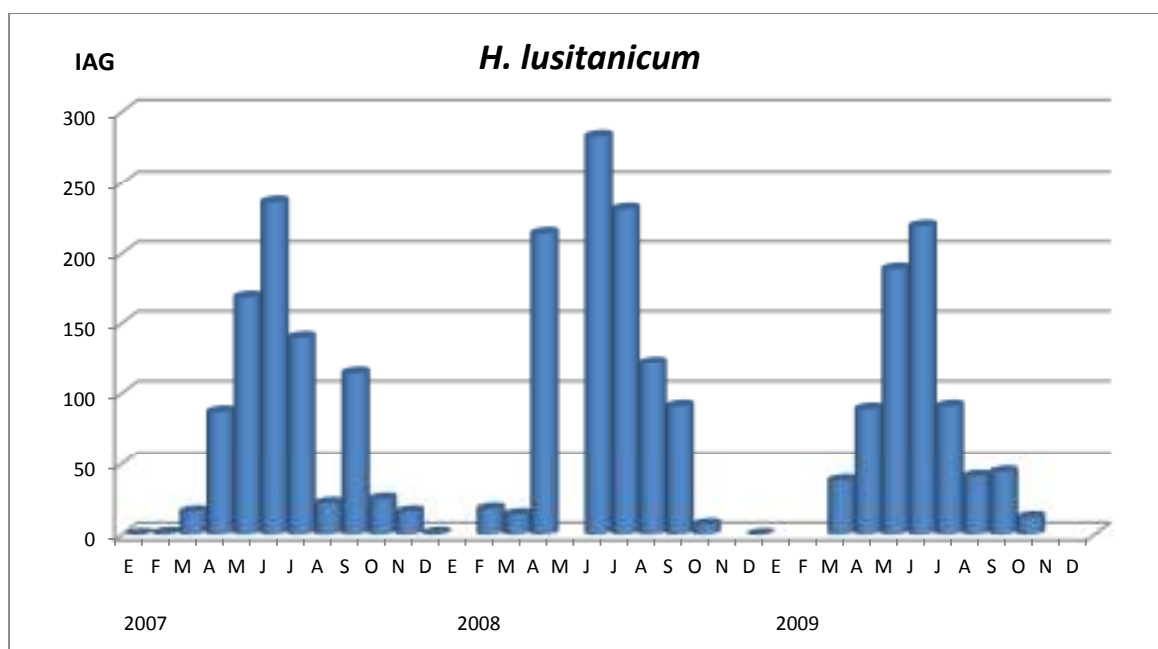
Dado que *H. lusitanicum* fue la especie más abundante, con casi el 96% de todas las garrapatas recogidas, su dinámica en la vegetación prácticamente se solapa con los datos globales de garrapatas (Apartado 5.1.). *H. lusitanicum* es considerada una especie endófila en sus estadios inmaduros y exófila en su estadio adulto, siendo ésta, probablemente, la razón por la que estos últimos se encontraron sólo de forma esporádica en suelo. Por el contrario, los adultos permanecieron activos todo el año con máximos en junio (Gráfica 14), sin que se produzca una verdadera diapausa invernal como la que presentan otras especies.

Así, a pesar de que se detectó también en los meses más fríos, su presencia en la vegetación aumentó progresivamente de marzo a junio para disminuir gradualmente desde ese momento a casi desaparecer en diciembre-enero.

Al analizar estos datos hay que tener en cuenta que las condiciones climáticas de los muestreos pueden condicionar los resultados, a pesar de los esfuerzos realizados para seleccionar días propicios, manteniendo siempre el mismo horario. Tampoco hay que olvidar que la técnica de

arrastre no garantiza la recuperación de todos los ejemplares, sino sólo de parte de las garrapatas que activamente accedan a la bandera, hecho del todo improbable en esta especie cuando el suelo está excesivamente húmedo, congelado o nevado o si el día es ventoso.

El hecho de recuperar ejemplares durante todo el año indica que los adultos sin alimentar tienen una gran capacidad de supervivencia a las condiciones adversas, permaneciendo en sus refugios y saliendo de ellos exclusivamente cuando las condiciones del día lo permiten. Por ello, los datos de estacionalidad del suelo permiten precisar no sólo la mayor abundancia en ciertas épocas, sino también las condiciones más favorables para buscar activamente al hospedador.

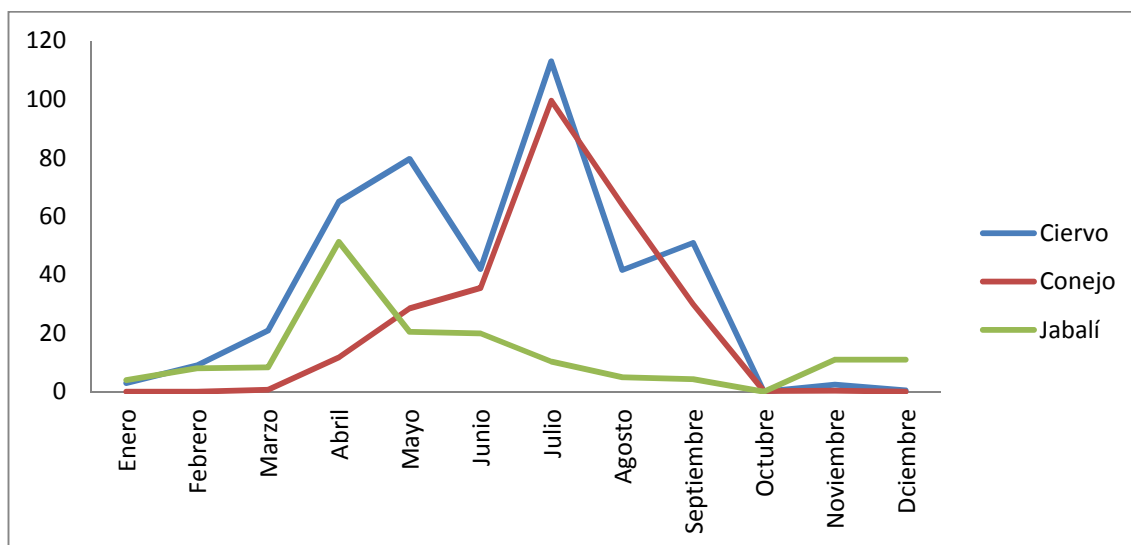


Gráfica 14. Índice de abundancia de *H. lusitanicum* (IAG) en la vegetación durante los tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

5.3.6.2. *H. lusitanicum* en los hospedadores

La alimentación de los ejemplares adultos presentó un modelo tricúspidal (abril/mayo-junio-septiembre) siendo el primero de ellos el más elevado y mantenido en el tiempo (Gráfica 15). Aunque fueron identificados en las tres

especies animales muestreadas, fueron los ciervos los que mostraron una mayor carga de esta especie y estadio.



Gráfica 15. Presencia de *H. lusitanicum* en animales durante los tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

Los estadios inmaduros de *H. lusitanicum* se alimentaron mayoritariamente en conejo con infestaciones menores en ciervo. La presencia de parasitación por inmaduros se inició en abril, aumentó paulatinamente hasta alcanzar un máximo en julio, reduciéndose a partir de ese mes hasta desaparecer completamente en octubre. Analizando separadamente los estadios, se comprueba que existe, lógicamente, una coincidencia estacional entre la parasitación por larvas y ninfas. Así, en abril se observa el primer repunte de alimentación de larvas en conejos y un mes después su alimentación como ninfas. El segundo repunte de larvas, mucho más acusado que el anterior, se detectó en junio, mudando posteriormente a ninfas que se alimentaron en agosto.

5.3.6.3. Fenología global de *H. lusitanicum*

En la Gráfica 16 se observan de forma conjunta los datos de IAG en la vegetación e IP en los hospedadores. Se puede concluir que esta especie se mantiene activa todo el año, aunque con niveles mínimos durante los meses de noviembre y diciembre. Puede también comprobarse que pueden

llegar a darse dos generaciones completas y dos parciales (considerando como tal desde hembra grávida hasta que su progenie llega a estadio adulto).

En función del momento en el que se inicie cada una los tiempos requeridos para completar cada fase del ciclo son variables. Así, las generaciones (G1) que se inician a principio de año (febrero) completan su ciclo en 5-6 meses (junio-julio), las que comienzan en abril-mayo (G2), requieren 4 meses, y finalmente las hembras grávidas que se desprenden a final del verano (G3), pasan el invierno en ese estadio reanudando su actividad de forma simultánea con aquellas que se desprenden en febrero (G1), por lo que deben invertir hasta 9 meses en cerrar el ciclo.

A continuación, tratamos de describir cada uno de los modelos.

La **primera generación** (G1) se inicia con las primeras hembras grávidas recogidas ese año (febrero) que caerán al suelo y necesitarán un periodo de unos dos meses para completar la oviposición y eclosión de las larvas (L1), que se alimentarán en marzo, mudarán a ninfas (N1) e iniciarán la alimentación en abril para mudar a adultos y ser responsables del pico máximo de actividad de adultos en vegetación detectado en junio (A1) y en animales un mes después (G3).

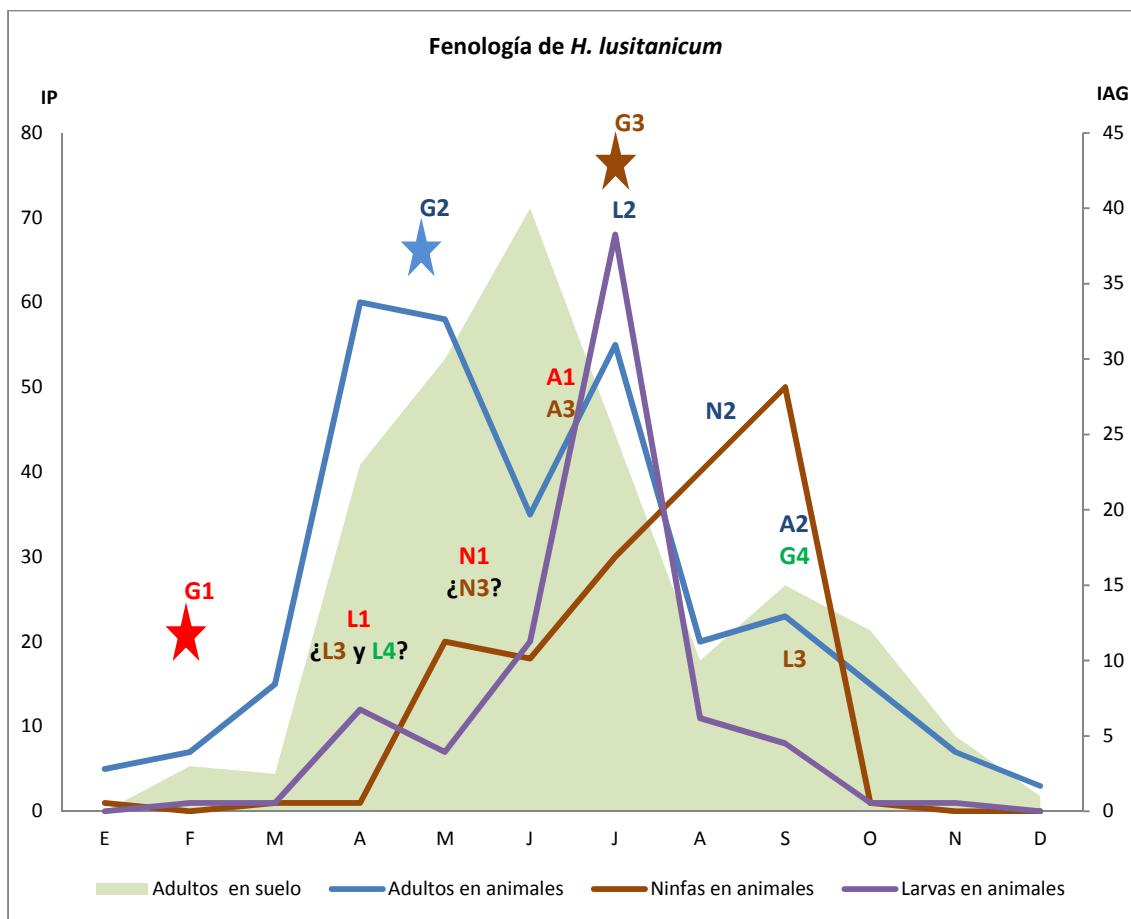
Las hembras grávidas alimentadas en abril y mayo constituyen el inicio de la **segunda generación** (G2) que da lugar a larvas (L2) que se alimentan masivamente en julio, mudan a ninfas alimentándose en este estadio en agosto (N2) y finalmente cierran su ciclo con los adultos detectados tanto en vegetación (A2) como parasitando animales en septiembre (G4).

Según se ha comentado anteriormente, al completarse el ciclo de la primera generación, los adultos generados se alimentan en julio, siendo el punto de partida de la **tercera generación** (G3) del año, cuyas larvas se alimentan en pequeña proporción en septiembre (L3) y no hay evidencia de su alimentación como ninfas.

Finalmente, la **cuarta generación** (G4) que proviene de la segunda, se inicia en septiembre con la alimentación de las hembras que deben caer al suelo, sin que quede ninguna constancia de la continuación del ciclo según los datos obtenidos en campo. Sin embargo, por la experiencia en el mantenimiento de la especie en condiciones de laboratorio podemos completar la información con la hipótesis de que, al menos algunas de ellas sobrevivan al invierno e inicien la oviposición en febrero, sumándose a la G1. Esta hipótesis se confirma con los datos obtenidos por Ouhelli y Pandey (1984), que comprobaron que algunas hembras grávidas mantenidas a temperaturas inferiores a 16 °C sobrevivían durante un año y eran capaces de ovipositar puestas viables al ser transferidas a 25°C con 80 % HR.

La diversidad del periodo de duración del ciclo, según la época se justifica por las condiciones ambientales; así, diversos autores (Chen y col., 2009; 2012; Siroky y col., 2011; Alhamed y col., 2003; Ahmed y col., 2011) demuestran que la temperatura y humedad relativa influyen notablemente en la duración del ciclo, siendo el primer factor el más influyente al incrementar la actividad metabólica y acelerar los procesos de preoviposición y endurecimiento de cutículas tras nacimiento o muda. En nuestro caso, hemos podido comprobar en campo (Apartado 5.1.) como a partir de 6-10°C aumenta la población de garrapatas proporcionalmente al aumento de la temperatura. Esto explicaría de una forma simplista la dinámica anual de población de garrapatas en la vegetación.

Otro factor determinante en la naturaleza, es la disponibilidad de hospedadores que afecta de forma determinante los tiempos de búsqueda o espera, influyendo en la duración del ciclo. Dada la abundancia de hospedadores en la zona de estudio, estos tiempos de vida libre probablemente no dependan tanto, en nuestro caso de su disponibilidad, sino de las condiciones ambientales que les permitan su búsqueda.



Gráfica 16. Fenología de *H. lusitanicum*, en animales (IP) y en vegetación (IAG) durante los tres años de estudio en una explotación silvo-agro-cinegética localizada en un ecosistema mesomediterráneo.

L=larva; N=ninfa; A=adulto; G=generación; las estrellas indican los momentos en los que se encontraron hembras grávidas sobre los animales y por tanto el inicio de las diferentes generaciones.

5.3.6.4. Ciclo biológico de *H. lusitanicum* en condiciones de laboratorio

Los datos de campo nos permitieron fijar los periodos y la actividad de la especie durante todo el año, sin embargo, la existencia de tantas variables impedía comprobar algunos datos de su fisiología y necesidades que en el futuro podríamos aplicar en el desarrollo del método integrado de control que se pretendía desarrollar. Por eso, siguiendo una metodología suficientemente contrastada y conocida se planteó cerrar también el ciclo de *H. lusitanicum* en condiciones controladas de laboratorio. El éxito de alimentación fue escaso por cuanto sólo se consiguió completar el ciclo con dos hembras, a pesar de partir de la puesta de 9 ejemplares. El factor limitante del éxito fue, sin duda, la alimentación de los adultos en oveja.

Así se pudo comprobar que a las condiciones estándar de mantenimiento de garrapatas en laboratorio (22-24 °C y HR superior al 70%), luz natural y alimentando los inmaduros en conejo y los adultos en oveja, el tiempo requerido para completar el ciclo fue de tres meses y medio a seis meses (101 a 193 días) totalmente acorde con los resultados obtenidos en campo.

Todas las hembras iniciadoras de la colonia fueron recogidas de ciervos como hembras grávidas en el mes de enero, correspondientes, por tanto con la primera generación (G1) de campo. En el laboratorio la oviposición fue muy corta, ocho días. El periodo de oviposición fue también bastante homogéneo, de unos quince días, si bien el tiempo que requirieron las larvas para eclosionar fue muy variable, entre 8 y 36 días. Los periodos de alimentación fueron de media 6 días para las larvas, 11 para las ninfas y 17 para los adultos. La muda de larva a ninfa se produjo a los 11-22 días de la repleción de las primeras, con una media de 16 días, siendo este periodo en el paso de ninfa a adulto mucho más homogéneo (20-24 días) (Tabla 18).

Pre-oviposición	Oviposición	Eclosión	Pre-alimentación	Alimentación	Muda	Total
8	16 (15-17)	Larvas 22 (8-36)				
			Larvas 15	6 (5-7)	16 (11-22)	37 (31-34)
			Ninfas 13	11 (9-13)	22 (20-24)	46 (42-50)
			Adultos 20	17		37
						Total 101-193

Tabla 18. Duración (días) de los distintos periodos del ciclo de *H. lusitanicum* en condiciones controladas de laboratorio.

Al comparar los resultados con los escasos datos bibliográficos al respecto se comprueba que son acordes a los descritos para la misma especie y en idénticas condiciones por Ouhelli y Pandey (1984), si bien en su caso, parte de las puestas tardaron hasta 72 días en eclosionar y ello afectó al tiempo total requerido para cerrar el ciclo que se prolongó hasta 158-167 días. Por la experiencia adquirida, podemos pensar que estas variaciones pueden deberse al distinto comportamiento de esta especie de acuerdo a las condiciones climáticas y estacionales en las que las hembras fueron recogidas.

Los mismos autores, comprobaron que el conejo no es un buen hospedador de la fase adulta, dato que comprobamos en nuestros resultados de campo. De igual manera, en ambos casos se corroboró que *H. lusitanicum* en su estadio adulto, a diferencia de los inmaduros, no se alimenta en conejos, por lo que utilizaron ovejas y becerros para alimentarlos y concluyeron que esta especie se comporta siempre como trifásica, a pesar de las condiciones, a diferencia de algunas otras especies del género (*H. dromedarii* o *H. annatolicum*) que son bifásicas si se alimentan en conejo y trifásicas si lo hacen en camellos o cabras (Alahmed y Kheir, 2003; Ahmed y col., 2011).

Dada la escasa bibliografía sobre esta especie en concreto, se procedió a obtener los datos de otras especies próximas del género *Hyalomma* (Tabla 19), si bien en especies bifásicas, como *H. dromedarii* y *H. rufipes*, los periodos de incubación y oviposición fueron considerablemente más largos. Otra característica notable de *H. dromedarii*, es que casi la mitad del ciclo biológico fue para el desarrollo de los huevos, característica que comparte con *H. lusitanicum* de acuerdo a Ouhelli, y que concuerda con nuestras observaciones.

Así, la información del ciclo biológico en condiciones controladas permitió confirmar y comprobar la fiabilidad de la hipótesis de los ciclos biológicos observados en condiciones de campo.

Especie	Huevo	Larva alimentada	Muda L-N	Ninfa alimentada	Muda N-A	♀ alimentada	♀ oviposición	Total
<i>H. asiaticum</i>	38,8	5,8	10,7	6	26	10,1	47,4	152
<i>H. aegyptium</i>	31	5,1	16,6	6,9	23,8	24,9	38,3	147
<i>H. dromedarii</i>	62	-	-	14	19	12	68.6	127
<i>H. rufipes</i>	59,1	-	-	21,4	26,1	14,8	51,9	179
<i>H. anatolicum</i>	22	3,91	14,9	5,35	13,6	8,1	27,35	106
<i>H. lusitanicum</i>	36	6	11,5	11	22	17	16	154

Tabla 19. Duración (días) de los distintos períodos del ciclo de diferentes especies de *Hyalomma* en condiciones de laboratorio.

H. asiaticum (Chen y col., 2009), *H. aegyptium* (Siroky y col., 2011), *H. dromedarii* (Alhamed y col., 2003), *H. rufipes* (Chen y col., 2012), *H. annatolicum* (Ahmed y col., 2011).

5.4. TRATAMIENTOS EN SUELO CON ÁCIDO OXÁLICO

Los ensayos con *A. americanum*, *A. maculatum* e *Ixodes scapularis* llevados a cabo por Kirkland y colaboradores (2005), y los publicados por Olmeda y col. (2008) con *H. lusitanicum*, son los únicos antecedentes sobre el efecto ixodicida del Ácido Oxálico (OA). Como se trató en el apartado correspondiente, el objetivo de este ensayo, fue determinar si el reconocido efecto del AO demostrado en laboratorio (Olmeda y col., 2008) se mantenía también en condiciones de campo y su repercusión en el ecosistema. La aplicación se realizó con dos métodos distintos; manguera y aplicación mediante ultra bajo volumen, a distintas concentraciones (0,5; 1; 3; 6,3 y 10%) y en zonas de diferente cubierta vegetal (encinar, olivar, eucaliptal y pinar).

En todos los casos, independientemente de la forma de aplicación y la concentración, se observó una reducción del IAG al compararlo con el de las parcelas control negativo (Tablas 20 y 21).

ENSAYO DE APLICACIÓN DEL AO CON MANGUERA

Los resultados obtenidos al aplicar AO con manguera fueron los siguientes. A una concentración de AO del 6,3% y la reducción de adultos de *H. lusitanicum* en suelo osciló entre el 100 y el 77,92%, a las 24 horas del tratamiento, según el ensayo; a la concentración del 3% la reducción se estableció entre el 65,94 y el 95,90% al compararla con el IP de las parcelas control del encinar y el 85,28% en el olivar; a 1% de concentración de ácido oxálico, la reducción en encinar fue tan sólo del 21,26%, sin que hasta el momento se pudiera establecer una causa para estos malos resultados.

Ensayo	Parcelas (n) Superficie (m ²)	Concentración AO (%)	IAG		Reducción de garrapatas (vs -C) (%)	Diferencia estadísticamente significativa
			Media	DE		
Encinar	9 13.500	6,3	5,67	2,03	77,92	98%
		-C	25,67	13,01	-	-
		+C	4,00	1,00	84,42	98%
Encinar	12 18.000	6,3	0,00	0,00	100,00	98%
		3,0	0,67	1,50	95,90	98%
		-C	16,33	2,65	-	-
		+C	2,00	2,65	87,75	98%
Encinar	25 37.500	3,0	3,20	2,36	65,94	95%
		1,0	7,40	12,10	21,26	n.s (90%)
		0,5	3,30	2,17	59,56	n.s (90%)
		-C	9,40	6,35	-	-
		+C	2,40	2,3	74,46	98%
Olivar	25 37.500	3,0	4,30	5,02	85,28	99%
		1,0	10,20	5,76	68,71	95%
		0,5	16,20	15,37	50,31	95%
		-C	32,60	13,69	-	-
		+C	4,20	2,17	87,12	99%

Tabla 20. Reducción del Índice de Abundancia de Garrapatas de la garrapata *Hyalomma lusitanicum* después de la aplicación de diferentes concentraciones de ácido oxálico (AO) con manguera bajo condiciones de campo en un área mesomediterránea.

Por cuanto como veremos a continuación a una concentración más baja en este mismo lugar y la misma concentración en el olivar mostraron datos acorde con lo esperado (1% olivar reducción 68,71%); finalmente, concentraciones del 0,5% produjeron reducciones del 59,56% y del 50,31%, en encinar y olivar, respectivamente.

ENSAYO DE APLICACIÓN DEL AO CON UBV

El potencial gasto de mano de obra que suponía el uso de manguera, llevó a ensayar el tratamiento de AO en suelo mediante aplicador de ultra bajo volumen. Este sistema presentaba la gran ventaja de su difusión automática desde el tractor, su mayor capacidad de dispersión y el consiguiente ahorro de producto y mano de obra. Este hecho, sin embargo, constituyó un primer problema ya que concentraciones eficaces aplicadas con manguera a razón de 400l/1500 m², al ensayarlas con este sistema y a pesar de limitar al máximo la velocidad del tractor y utilizar boquillas que eliminaran la mayor cantidad de líquido posible, la cantidad era ineficaz. Por eso se optó por utilizar AO al 10% en este tipo de aplicación.

Ensayo	Parcelas (n) Superficie (m ²)	Concentración de AO (%)	IAG Media DE		Reducción de garrapatas (vs -C) (%)	Diferencias significativas
Eucaliptal	1 4.000	10,0	0,19		62,50	
		-C	0,50			
Pinar	1 4.000	10,0	0,00		100,00	
		-C	0,04			
Encinar	5 4.000	10,0	0,06	0,08	79,69	95%
		-C	0,30	0,35		
Todos los ensayos con UBV	7 28.000	10,0	0,07	0,09	75,86	99%
		-C	0,29	0,32		

Tabla 21. Reducción del Índice de Abundancia de Garrapatas de la garrapata *Hyalomma lusitanicum* después de la aplicación de ácido oxálico (AO) con ultra bajo volumen bajo condiciones de campo en un área mesomediterránea.

Una desventaja, que compartía con el uso de manguera a presión, era que su aplicación estaba limitada a zonas accesibles en tractor. También con este sistema de aplicación, y una vez adaptada la dosificación del producto al 10%, las reducciones de IAG fueron significativas con respecto al control negativo, con una media de 75,6%, si bien, varió según el ensayo entre el 62% en el eucaliptal, el 79,7% en el encinar y el 100% del pinar (Tabla 21). Así pues, el AO aplicado en campo con ambos sistemas redujo de forma significativa la población de garrapatas de la vegetación. En cualquier caso es también importante notar que se deben tomar medidas de protección personal cuando se dosifica y no se debe permitir presencia humana o animal cuando se está administrando el producto hasta 5-10 minutos después de la aplicación. Por otra parte, el efecto en suelo, es necesariamente corto, al degradarse rápidamente, este hecho garantiza que no constituye un residuo acumulable que a largo plazo lo que podría devenir en un nuevo problema.

La aplicación de tratamiento con manguera requirió de un trabajador que invirtió alrededor de 45 minutos para tratar una parcela de 1,500 m² por lo que este sistema se adaptaría al control de *H. lusitanicum* en áreas pequeñas. Las reducciones se relacionaron directamente con las concentraciones ensayadas, así a mayor concentración correspondieron reducciones más intensas. Sin embargo, teniendo en cuenta el coste, el trabajo de dilución y de manejo y en relación al rendimiento, la concentración del 3% resultó la más conveniente, con resultados algo inferiores a la concentración mayor (6%) pero con la mitad de coste de producto. También el método de aplicación de AO mediante UBV fue efectivo para la reducción de garrapatas en suelo a corto plazo, con la ventaja que supone la posibilidad de tratar grandes superficies de una forma rápida (un solo trabajador puede tratar una parcela de 4,000 m² en diez minutos). Una vez que se dispone del dispositivo de aplicación UBV, el coste es menor tanto en personal como en gasto de producto (25 kg y 67 kg para 4.000 m² de parcela; UBV y manguera respectivamente). La principal desventaja de este sistema es que requiere facilidad de acceso para todo el sistema, en zonas relativamente llanas y con arbolado separado ya que la

capacidad de dispersión del producto cubre una distancia de 10 m a cada lado del tractor.

Empleando cualquiera de los dos sistemas, el ácido oxálico puede ser una herramienta útil para la reducción puntual de la población de *H. lusitanicum*, si bien por su poca persistencia debería repetirse, según una cadencia establecida, o complementarse con otros tipos de control. En explotaciones pequeñas la aplicación con manguera es sencilla y altamente eficiente. En grandes áreas o en explotaciones en las que sea posible disponer de un aparato de ultra bajo volumen (UBV) su utilización reduce el costo humano y de producto manteniendo una eficiencia similar (Valcárcel y col., 2014).

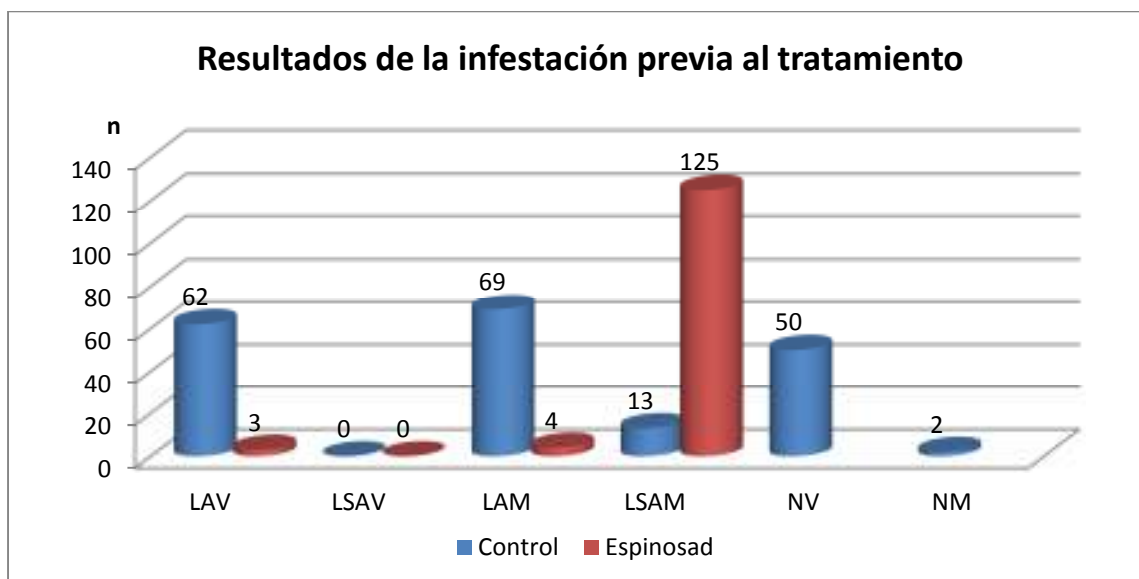
5.5. ENSAYOS EN CONEJOS EXPERIMENTALMENTE INFESTADOS EN CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO

ENSAYO 1: EFICACIA IXODICIDA DEL ESPINOSAD ADMINISTRADO POR VÍA ORAL EN INFECCIONES EXPERIMENTALES

Tras la identificación de *H. lusitanicum* como la especie de garrapata que constituía el problema en la zona de control y constatar que los estadios inmaduros de esta especie se alimentan fundamentalmente en conejos, se determinó que se podría actuar sobre estos mamíferos como método de control de las garrapatas que los parasitaban. El único sistema de manejo que se ejerce sobre esta población silvestre es la suplementación de comida en tolvas durante los meses más cálidos. Aprovechando que esta época era la de máxima parasitación, la aplicación oral de un producto ixodicida podría ser una alternativa.

En este ensayo, se evaluó la actividad ixodicida de 480 µl de espinosad (240 µl/kg) a 6 conejos de laboratorio frente una parasitación experimental con larvas de *H. lusitanicum* en dos tiempos, 24 horas antes (primera infestación) y 24 horas después (segunda infestación) de la aplicación del tratamiento, para constatar el posible efecto ixodicida y/o repelente o antialimentación del producto.

De la **primera infestación** se recuperaron de los lotes tratados un total de 3 larvas vivas y 129 muertas (125 sin alimentar y 4 parcialmente alimentadas) de las 300 aplicadas, con una tasa de alimentación del 1% y 62 vivas y 82 muertas (13 sin alimentar y 69 alimentadas) de los lotes control, con una tasa de alimentación del 20,8%. Además, ninguna de las larvas alimentadas del lote tratado consiguió mudar a ninfa (éxito de muda L-N 0%), frente a las 52 que lo hicieron en el lote control (éxito de muda L-N de las alimentadas del 80,6%). Concluyendo, ninguna de las trescientas larvas que se pusieron a alimentar en los conejos tratados consiguió completar su ciclo hasta el paso a ninfas, frente al 17% que lo hicieron en el lote control (Gráfica 17), comprobándose así el efecto ixodicida del producto aplicado una vez que las garrapatas ya estaban prendidas en el hospedador. Estos resultados están en la dirección de los descritos por Snyder y col. (2009) en perros.

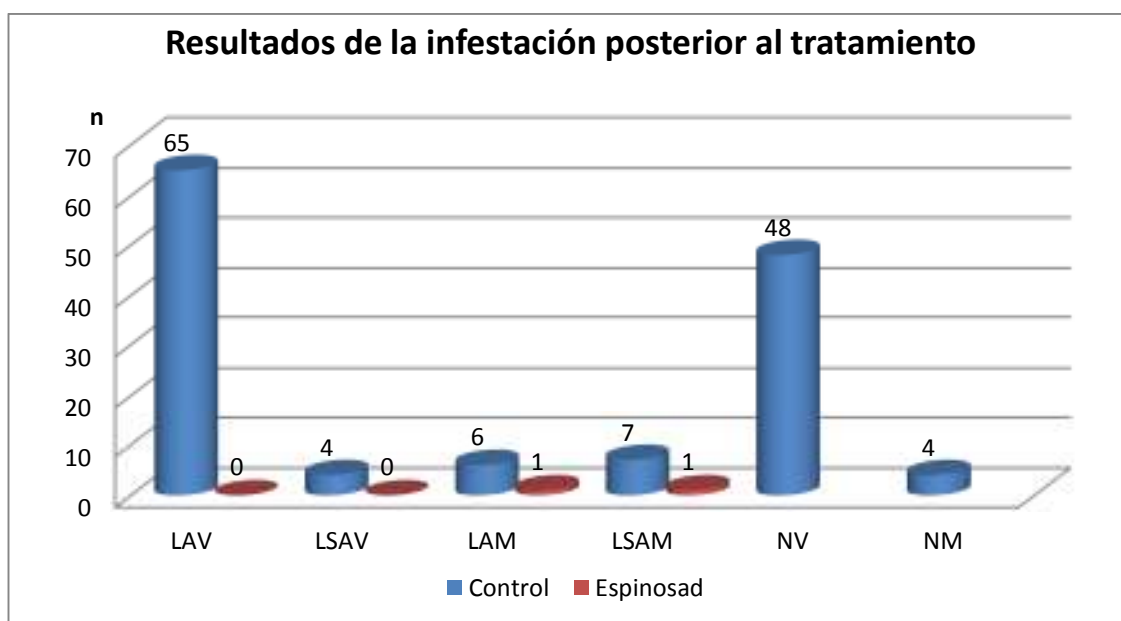


Gráfica 17. Eficacia ixodicida del espinosad administrado por vía oral 24 horas después de la infección experimental con larvas de *H. lusitanicum*.

LAV= Larvas Alimentadas Vivas, LSAV= Larvas Sin Alimentar Vivas, LAM= Larvas Alimentadas Muertas, LSAM= Larvas Sin Alimentar Muertas, NV= Ninfas Vivas y NM Ninfas Muertas.

En relación con la **segunda infestación**, llevada a cabo 24 horas después de administrar el producto, los resultados fueron aún más evidentes por cuanto, tan solo se recuperaron dos larvas de los lotes tratados, una alimentada y otra sin alimentar, pero ambas muertas (Gráfica 18). En el lote

control, por el contrario se recuperaron 69 larvas (65 alimentadas y 4 sin alimentar), de las cuales 52 mudaron a ninfas, con un éxito de muda de L-N del 80%, al igual en la primera infestación. De igual forma el porcentaje de larvas que consiguieron alimentarse y mudar a ninfas en el lote control de esta segunda alimentación coincidió con la primera en un 17%. Así pues, los datos confirman que el espinosad a dosis forzada de 480 mg/kg tienen actividad ixodicida y antialimentaria en un corto plazo de tiempo y por ingesta forzada de una dosis elevada del producto pero era imprescindible, dada la previsión de utilización en condiciones de campo que los animales lo aceptaran voluntariamente. También se planteaba demostrar, si el efecto residual observado por Snyder y col. (2009) se mantenía también en nuestras condiciones y para ello se planteó un segundo grupo de experimentos.



Gráfica 18. Eficacia ixodicida del espinosad administrado por vía oral 24 horas antes de la infección experimental con larvas de *H. lusitanicum*.

LAV= Larvas Alimentadas Vivas, LSAV= Larvas Sin Alimentar Vivas, LAM= Larvas Alimentadas Muertas, LSAM= Larvas Sin Alimentar Muertas, NV= Ninfas Vivas; NM= Ninfas muertas.

ENSAYO 2: DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE ESPINOSAD INGERIDA LIBREMENTE EN PIENSO.

Los tres conejos del lote control consumían diariamente prácticamente la totalidad del pienso administrado, en tanto que los tratados reducían la ingesta de relación directa de la dosis recibida en un claro rechazo al

producto. Así, los animales que habían recibido dosis de tratamiento de 60 mg/kg de espinosad redujeron la ingesta un 10%, los que recibieron dosis de 240 mg/kg un 50% y los que recibieron dosis de 480 mg/kg redujeron la ingesta un 87% con respecto a los controles. Se determinó entonces la dosis real recibida por cada grupo observándose que, a pesar de la reducción en el consumo de pienso, el lote de 240 era el que había recibido una dosis mayor de espinosad (140 g) frente a los 107 g del lote de 60 y tan sólo 60 g del lote de 480 (Tabla 22).

Así, se concluyó que había que tener en cuenta que piensos tratados con dosis elevadas de espinosad eran mal toleradas por los conejos que preferían permanecer en ayuno. Por otra parte, dosis muy bajas eran mejor toleradas, pero no compensaban el rechazo provocado por el tratamiento. Así, para obtener los mejores resultados había que tratar el pienso con dosis medias no demasiado rechazables por los animales, pero que garantizaran el tratamiento de los animales, si bien quedaba por determinar la eficacia de estas dosis frente a las garrapatas.

Dosis (mg/kg)	Pienso Administrado (g)	Pienso Comido (g)	Espinosad Consumido (mg)
Control	165,5 (156,7-170,5)	163,5 (154,8-170,5)	-
60	164,4 (156,3-170,3)	147,1 (116,4-164,9)	106,9 (89,4-115,8)
240	165,5 (169,3-170,2)	82,6 (71,7-99,8)	140,1 (101,6-152,6)
480	150	20	60

Tabla 22. Espinosad consumido libremente por los conejos en función de la dosis de partida administrada en el pienso.

ENSAYO 3: EFICACIA IXODICIDA DEL ESPINOSAD INGERIDO LIBREMENTE EN INFECCIONES EXPERIMENTALES

Una vez definida la tolerancia de los conejos al espinosad en pienso, se evaluó la eficacia empleando tres concentraciones diferentes: 60, 120 y 240 mg/kg frente a ninfas de *H. lusitanicum* de la colonia de laboratorio, en dos

infestaciones por lote una pre-tratamiento (primera infestación) y otra 28 días post-tratamiento (segunda infestación).

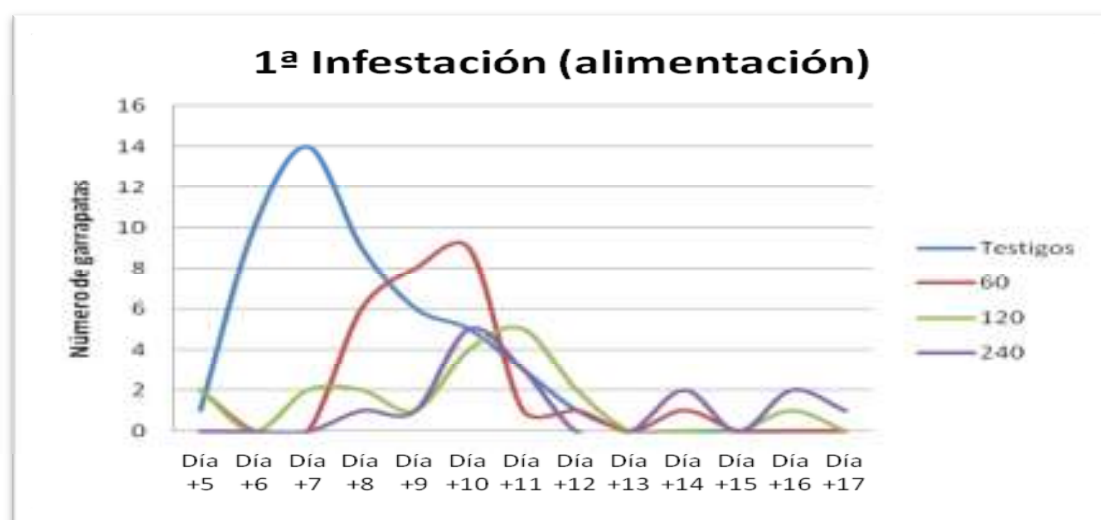
Todos los lotes tratados de la primera infestación presentaron una reducción en el porcentaje de alimentación de las ninfas superior al 50% al compararlo a los lotes control. El mejor resultado se obtuvo a la dosis de 120 mg/kg con una reducción del 71%. Además, no sólo los porcentajes se vieron afectados sino también los tiempos de alimentación. Así, el control requirió 3-4 días menos –y lo hicieron en mayor número- que las ninfas alimentadas sobre conejos tratados con espinosad. En los animales tratados, las ninfas necesitaron mayor tiempo para alimentarse de forma proporcional al aumento de la dosis administrada (Gráfica 19). Con las dosis más altas, 120 y 240 mg/kg, se observaron un 11 y un 13% de ninfas parcialmente alimentadas, respectivamente. Las diferencias en la alimentación de los controles y los tratamientos fueron estadísticamente significativas. Igualmente, también lo fueron entre los tratamientos 60 y 120 mg/kg.

Grupo	% Reducción Alimentación	% Reducción de la muda	Eficacia %
PA 60	50	-5,77	51,0
SA 60	-9,3	8,51	0
PA 120	71,2	27,56	69,4
SA 120	23,3	-7,50	17,5
PA 240	65,4	66,45	93,87
SA 240	11,6	26,44	35

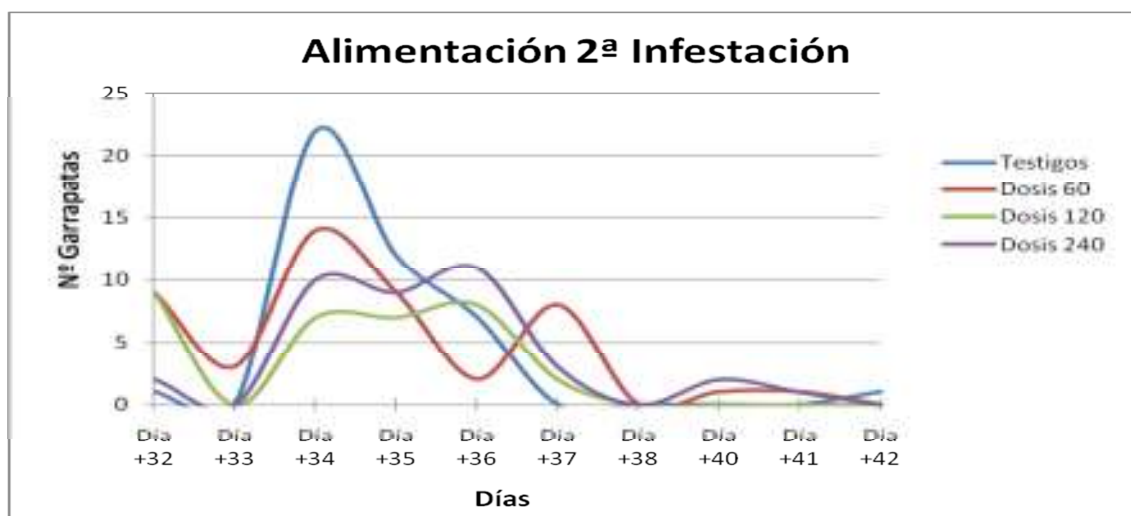
Tabla 23. PA: Primera alimentación: se observa que la eficacia del producto está directamente relacionada con la dosis, obteniendo valores máximos al administrar 240 mg/Kg de espinosinas a los conejos. SA: Segunda alimentación: la eficacia se reduce considerablemente 28 días después del tratamiento como puede observarse en la tabla superior.

En cuanto a la muda, en la infestación pretratamiento, la mayoría de las ninfas del lote control mudaron simultáneamente el día 41, en tanto que las de los lotes tratados mostraron una prolongación ligera en el periodo de muda. Sin embargo, el hecho más notable es que a partir de la dosis de 120 mg/kg se redujo sensiblemente, y en forma proporcional a la dosis, el número de ejemplares que mudaron a adultos (27,6 y un 66,5% para las dosis 120 y 240 mg/kg, respectivamente (Tabla 23, Gráfica 20). La

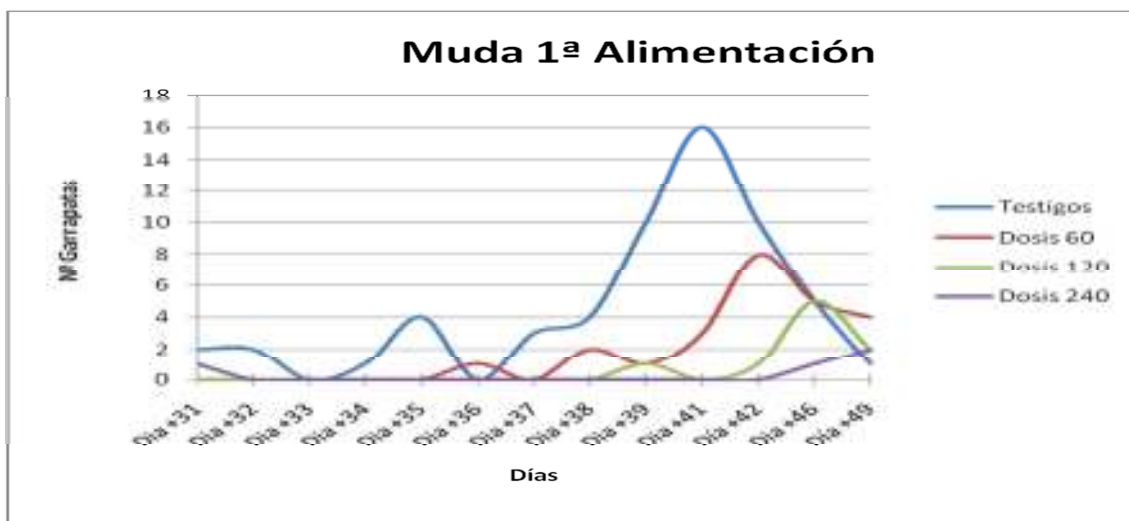
diferencia entre el porcentaje de muda fue estadísticamente significativa entre los tratamientos y el control así como entre los diferentes tratamientos excepto el 120 y 240 mg/kg. Las reducciones en los porcentajes de alimentación y muda en la segunda infestación, 28 días post-tratamiento, no fueron tan evidentes como la primera, si bien destaca el 23% menos de ninfas que se alimentaron a la dosis de 120 mg/kg y el 26% menor que mudaron a adultos en la dosis de 240 mg/kg. Se apreció también un retraso en la alimentación de las ninfas en animales tratados, con respecto a los controles, si bien el número de garrapatas que se alimentan fue similar, no observándose diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de alimentación de las distintas dosis con el control (Gráfica 21).



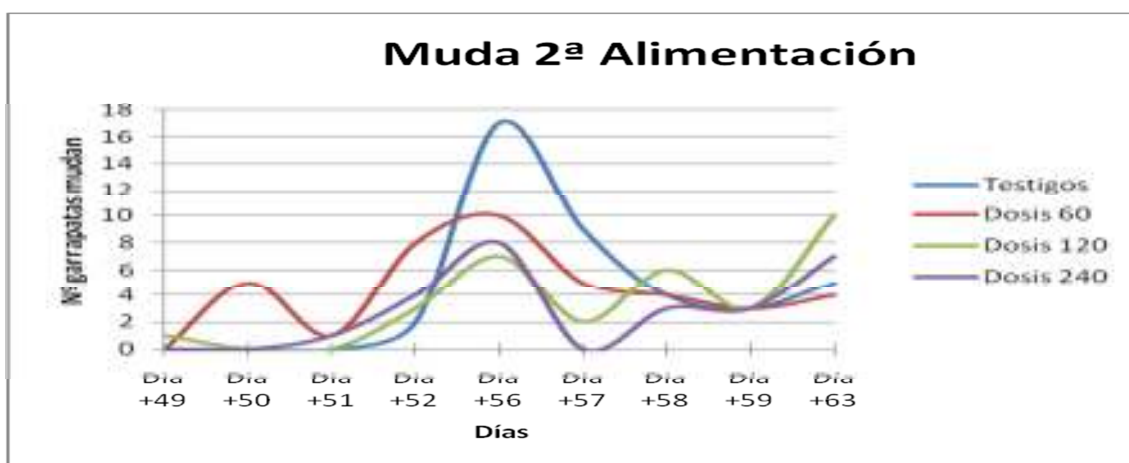
Gráfica 19. Eficacia ixodicida del espinosad ingerido libremente y administrado 24 horas antes de la infección experimental con ninfas de *H. lusitanicum* en conejos: efectos sobre la alimentación.



Gráfica 20. Eficacia ixodicida del espinosad ingerido libremente y administrado 24 horas después de la infección experimental con ninfas de *H. lusitanicum* en conejos: efectos sobre la alimentación



Gráfica 21. Eficacia ixodicida del espinosad ingerido libremente y administrado 24 horas antes de la infección experimental con ninfas de *H. lusitanicum* en conejos: efectos sobre la muda.



Gráfica 22. Eficacia ixodicida del espinosad ingerido libremente y administrado 24 horas después de la infección experimental con ninfas de *H. lusitanicum* en conejos: efectos sobre la muda.

En la infestación postratamiento no hubo retraso de la muda de las ninfas en los animales tratados, incluso el grupo de 60 mg/kg inició la muda antes que los controles. Aunque el número de ninfas que mudaron a adultos fue mayor en los controles no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los lotes tratados y el lote control (Gráfica 22).

En resumen, todas las dosis de espinosad ensayadas fueron eficaces en el control de infestación por ninfas de *H. lusitanicum* en conejos en condiciones de laboratorio. La eficacia de los tratamientos en las infestaciones ya en curso fue proporcional a la dosis empleada, alcanzándose un máximo de 93,9% con la dosis mayor (240 mg/kg). En

cambio, la eficacia bajó considerablemente (35%) cuando las ninfas se aplicaron a los 28 días del espinosad.

Por todo ello, puede afirmarse que el tratamiento en infestaciones en curso produce una evidente reducción y retraso en la alimentación, así como disminución de la muda, efecto proporcional a la dosis administrada, llegándose al 93,9% de eficacia. El producto tiene además efecto residual ya que, en los lotes de garrapatas que se colocaron cuatro semanas después del tratamiento, el efecto se mantuvo si bien la eficacia fue bastante menor (35%).

Estos resultados son similares a ensayos previos desarrollados por García-Rojo (2011), quien observó una eficacia del espinosad dependiente de la dosis en la alimentación y muda de ninfas de *H. lusitanicum*. Así mismo Davey y colaboradores (2011), trabajando con *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, observaron que los estadios inmaduros son más sensibles al efecto del espinosad que los adultos obteniendo reducciones del 90%.

Se concluye con estos resultados que el espinosad oral puede ser una alternativa en el control de parasitaciones porestadios inmaduros de la especie *H. lusitanicum*. Sin embargo, quedaba por determinar si los resultados obtenidos en conejos de laboratorio y con colonias propias de *H. lusitanicum* podían reproducirse en condiciones de campo.

5.6. ENSAYOS EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS EN CONEJOS DE CAMPO NATURALMENTE INFESTADOS

ENSAYO 4: EFICACIA IXODICIDA DEL ESPINOSAD ADMINISTRADO POR VÍA ORAL FORZADA EN INFESTACIONES NATURALES

Los conejos silvestres capturados para el estudio y confinados en cercados al efecto presentaron una parasitación natural por 5 especies de garrapatas. Si bien *H. lusitanicum* fue la más abundante, también se identificaron *Rhipicephalus pusillus*, *Haemaphysalis hispanica*, *Ixodes* spp, y *Dermacentor marginatus*, resultados concordantes con los de otros autores en la zona (Márquez-Jiménez y col., 2005).

Al recoger las garrapatas que parasitaban cada uno de los lotes se constató una reducción de garrapatas vivas del 93% en los conejos que habían recibido una dosis forzada de 480 mg de espinosad/kg de peso, frente a la parasitación de los controles (Tabla 24).

La conclusión del ensayo confirmó que el espinosad oral es eficaz en infestaciones naturales en conejos de campo. Igual que ocurriera en el ensayo anterior en condiciones experimentales, el siguiente objetivo sería determinar la dosis que los conejos silvestres aceptaban en la alimentación.

Grupo (n)	Garrapatas vivas (promedio)	Garrapatas muertas (promedio)	Total (promedio)	Reducción nº de garrapatas vivas %
Control (14)	109 (7,3)	55 (6,5)	164 (10,9)	-
Tratado (14)	8 (0,6)	222 (18,6)	230 (17,6)	93%

Tabla 24. Garrapatas recolectadas de los conejos silvestres naturalmente infestados por garrapatas, posteriormente a la administración del tratamiento con espinosad.

ENSAYO 5: DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE ESPINOSAD INGERIDA POR CONEJOS SILVESTRES LIBREMENTE EN DISTINTOS ALIMENTOS

Para determinar el grado de tolerancia de los conejos silvestres al espinosad se ensayaron distintos alimentos (pan/trigo) a libre disposición de los animales que serían utilizados posteriormente como vehículo para administrar el espinosad en condiciones de campo. Las menores dosis probadas fueron 200 g de pan con 45 ml de Elector® (equivalente a 21,6 g de espinosad) y 250 g de trigo con 17,5 ml de Elector® (equivalente a 8,4 g de espinosad).

En las primeras 24 horas, cuando el pan o el trigo (grupos 1 y 2) constituían la única fuente de alimento disponible, los animales consumieron cantidades muy similares. Si ambos alimentos se administraban simultáneamente (grupo 3) los conejos prefirieron el trigo al pan aunque la suma del alimento consumido (trigo + pan) fue similar al del grupo 1 (sólo trigo) y algo mayor que cuando solo se les administró pan (Grupo 2, Tabla 25). Los animales a

los que se les administró pan medicado (grupo 4) apenas ingirieron alimento.

El segundo día, el consumo de alimento no medicado se mantuvo prácticamente en los niveles del día anterior. Sin embargo, aunque se redujo la dosis del espinosad en los lotes tratados, se volvió a producir un rechazo casi absoluto del trigo medicado y la “masa sólida” (azúcar-agua-trigo-espinosad) medicada (grupo 3a y 3b) y bastante notable en los que recibieron trozos de pan duro con espinosad (grupo 4), un tercio de lo que ingirieron los conejos a los que se administró alimento no medicado, a pesar de este último lote era el más hambriento ya que casi no comieron el período anterior (Tabla 26).

Primeras 24 horas	Peso medio/ conejo	Alimento	Consumo diario/ conejo	Consumo diario/ kg conejo
Grupo 1	734,2 g	Trigo	27,6 g	37,6 g
Grupo 2	925 g	Pan	25 g	27,02 g
Grupo 3	680 g	Trigo Pan	18,4 g 6,8	27,1 g 10,1 g
Grupo 4	845 g	Pan medicado	4,7 g	5,56 g

Tabla 25. Cantidad de alimento consumido por conejo en las primeras 24 horas.

Segundas 24 horas	Peso medio/ conejo	Alimento	Consumo diario/ conejo	Consumo diario/ kg conejo
Grupo 1	734,2 g	Trigo	25 g	33,6 g
Grupo 2	925 g	Pan	27,8 g	30,1 g
Grupo 3a	680 g	Trigo medicado	0,2 g	0 g
Grupo 3b	680 g	Masa sólida	3,3 g	0,5 g
Grupo 4	845 g	Pan medicado	9,3 g	11g

Tabla 26. Consumo de alimento medicado y sin medicar, en las segundas 24 horas.

Las conclusiones de este ensayo fueron que el consumo efectivo de trigo o pan por conejo y día oscila entre 25 y 28 g/conejo; y que los conejos rechazan el alimento medicado con dosis elevadas.

ENSAYO 6: DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE ESPINOSAD INGERIDA LIBREMENTE EN PRESENCIA DE ALIMENTO NO MEDICADO

Dado el aparente rechazo de los conejos al consumo de alimento medicado con espinosad, nos propusimos determinar si el efecto se modificaba cuando el animal disponía de otras fuentes de alimentación, como, sin duda ocurriría en condiciones de campo. Conejos de campo capturados a tal fin recibieron 25 gramos de trigo, medicado o no, según el lote y hierba fresca.

En ninguno de los grupos se consumió todo el trigo, observándose una variación del consumo que osciló entre 17,3 y 22,9 g de trigo/conejo (lote 2 y 4, respectivamente) y entre 144 y 217 g de hierba/conejo (lotes 2 y 5, respectivamente). En los lotes 1 y 3 la hierba estuvo limitada a 36 g/conejo.

Debido a la gran dispersión de los datos de parasitación fue necesario retirar del estudio los valores extremos (máximo y mínimo) de cada lote. Se observó una reducción de garrapatas del 60% en los conejos tratados con respecto al lote control (Tabla 27). El análisis estadístico de la parasitación, mostró diferencias estadísticamente significativas entre el control (lote 5) y los tratamientos (lotes 1, 2, 3 y 6), a excepción del grupo que presentó un menor consumo de espinosad (lote 4).

Lote	Peso medio conejo/lote (kg)	Dosis para 25 g de trigo	Dosis real ingerida (mg/kg)	Consumo trigo+hierba/conejo	No. de garrapatas/ 8 conejos	Reducción de garrapatas (%)
1	1,17	120	99	20+36	80	66,8
3	1,17	120	99	20+36	120	50,2
6	1,17	115	79	17,3+0	96	60,2
2	1,17	60	55	23+144	110	54,4
4	1,17	60	41	17+169	162	32,8
5	1,17	0	Control	20+217	241	-

Tabla 27. Dosis de espinosad consumida por conejo y porcentaje de reducción de garrapatas a distintas dosis.

Estos datos sugieren que los conejos prefieren una dieta variada sin abusar de ninguna en particular y que la presencia de hierba no reduce la ingesta de trigo tratado. Sin embargo, el resultado más destacable del ensayo fue que la dosis eficaz mejor tolerada por los conejos silvestres era la de 100 mg/kg de conejo.

5.7. ENSAYO CON ESPINOSAD *IN VIVO* EN CONDICIONES DE CAMPO

El último ensayo consistió en la aplicación de los resultados y las experiencias adquiridas en apartados anteriores, para tratar con espinosad a conejos silvestres en completa libertad.

ENSAYO 7: DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA IXODICIDA DE LA DOSIS DE ESPINOSAD INGERIDA LIBREMENTE POR CONEJOS SILVESTRES EN COMPLETA LIBERTAD

En condiciones de campo, los conejos necesitaron cierto tiempo para aceptar el alimento medicado que ocupaba las tolvas con las que estaban familiarizados pero luego lo consumieron en un tiempo razonable. Así, para consumir la mitad del alimento se requirieron 13 días mientras que la otra mitad tardó tan solo 3 días en consumirse.

En cuanto a la parasitación por garrapatas hay que reseñar que a pesar de haber seleccionado de forma lo más homogénea posible las zonas el número de garrapatas de los conejos tratados fue siempre menor que el de los controles. Esta diferencia no fue significativa al inicio del estudio ($p=0,197$ y $p=0,468$ para el total de garrapatas y para *H. lusitanicum*, respectivamente) y si lo fue al final del ensayo (día 16 cuando los conejos habían ingerido todo el trigo suministrado para el total de garrapatas ($p=0,031$) pero especialmente para *H. lusitanicum* ($p=0,017$). Por ello, aunque las zonas seleccionadas no son totalmente comparables, la parasitación, en general, por garrapatas y, en particular, por *Hyalomma* se redujo significativamente en los conejos que recibieron alimentación con trigo tratado una vez que consumieron toda la dosis (Tabla 28).

ZONA		Inicio (día 0) (n=3)		Consumo mitad del trigo medicado (día 13) (n=3)		Consumo total del trigo medicado (día 16) (n=5)	
		Total	<i>H. lusitanicum</i>	Total	<i>H. lusitanicum</i>	Total	<i>H. lusitanicum</i>
TRATADOS	P	27,7	9,0	94,3	39,0	18,0	11,4
	C	43,0	20,0	81,0	68,3	44,2	36,6
CONTROL	A	39,0	21,0	190,0	125,0	80,6	65,8
	B	82,3	19,3	136,0	66,3,0	48,4	43,0

Tabla 28. Garrapatas recogidas de conejos de campo tratados con trigo medicado con espinosad administrado en tolva e ingerido libremente.

P = Palomas de San Serafín. C = Camino del Tubo. A = Arroyo Silverio. B = Baltasara.

A modo de conclusión de los ensayos realizados con el espinosad, pudimos demostrar su efecto acaricida frente a estadios inmaduros de *H. lusitanicum* y la viabilidad de la administración por vía oral tanto forzada como ingerida libremente y tanto en infestaciones naturales como experimentales. Es importante mencionar, que aun cuando se han identificado múltiple efectos sub letales y letales agudos en casi todos los grupos de artrópodos (Biondi y col., 2012), la toxicidad en Diptera, Thysanoptera, Coleoptera e Hymenoptera es baja así como frente a vertebrados y no resulta tóxico como residuo (Davey y col., 2001; Mayes y col., 2003). Lo cual hace del espinosad una excelente alternativa como medio de control biológico de garrapatas administrado por vía oral en conejos (Valcárcel y col., en prensa). Aun así, nos propusimos estudiar el posible efecto nocivo en los conejos silvestres.

5.8. TOXICIDAD DEL ESPINOSAD EN CONEJOS SILVESTRES

Existen numerosos informes donde se demuestra que la toxicidad del espinosad, tanto aguda como crónica, cuando se administra por vía oral es extremadamente baja. Así, la concentración de NOEAO (No Efectos Adversos Observables) en conejos es de ≥ 1650 ppm o ≥ 50 mg/kg/d y la de NEO (No Efecto Observable) en hembras gestantes y sus embriones es de 10 mg/kg/d y 50 mg/kg/d, sin producir efecto teratogénico, actividad mutagénica o alteraciones sistémicas en animales de laboratorio (Breslin y

col., 2000; EPA 2005). Además, el margen de seguridad es muy alto y su toxicidad ha sido determinada como requisito para su comercialización (EMEA, 2011). Aun así, en estudios a largo plazo en perros donde se administraron 973 mg/kg/d en el alimento, se encontraron las siguientes lesiones: células vacuolizadas en el bazo, folículos linfoides en múltiples tejidos, células acinares en páncreas y atrofia de la mucosa gástrica (EPA, 2005; EPA, 2009). Por ello, nos propusimos determinar si producía algún efecto en los conejos silvestres en los protocolos de tiempos y dosis empleados.

Aunque los resultados deben ser tratados con precaución dado el bajo número de animales estudiados, no se apreciaron lesiones de importancia en ninguno de los grupos, ni hubo diferencias destacables entre los lotes (lote 1: 240 mg; lote 2: 120 mg; lote 3: 60 mg y lote 4: control). A continuación se describen los hallazgos más notables (Tablas 29 a y b) y se adjuntan las imágenes correspondientes.

Órgano	Lote / conejos	Cambios histológicos
Encéfalo	1 (240 mg)/1 2 (120 mg) /1 y 2 3 (60 mg) /1 y 2 4 (control)	No se aprecia ninguna lesión en los cortes histológicos.
Pulmón	1 (240 mg) /1 2 (120 mg) /1 y 2 3 (60 mg) /1 y 2 4 (control)	Lotes 3 y 4, se aprecian algunas áreas de atelectasia junto a zonas enfisematosas
Riñón	1 (240 mg) /1 2 (120 mg) /1 y 2 3 (60 mg) /1 y 2 4 (control)	Focos dispersos de infiltrado inflamatorio en lotes 1 y 3 con presencia de neutrófilos y necrosis celular y acúmulos de fragmentos celulares.
Bazo	1 (240 mg) /1 2 (120 mg) /1 y 2 3 (60 mg) /1 y 2 4 (control)	Se aprecia deplección de la pulpa blanca, especialmente en los conejos 1 de los lotes 2, 3 y 4.
Hígado	1 (240 mg) /1 2 (120 mg) /1 y 2 3 (60 mg) /1 y 2 4 (control)	Focos necróticos coagulativos con infiltrado inflamatorio alrededor, mas notorio en los dos conejos del lote 2. Focos dispersos de infiltrado inflamatorio perivascular, mas en los conejos de los lotes 1 y 3.

Tabla 29a. Descripción de los hallazgos histológicos en las muestras de conejos silvestres tratados con diversas dosis de espinosad.

Órgano	Lote / conejos	Cambios histológicos
Estómago	1 (240 mg) /1 2 (120 mg) /1 y 2 3 (60 mg) /1 y 2 4 (control)	No se aprecian lesiones, pero sí la presencia de parásitos en la mucosa gástrica del animal 2 del lote 2.
Intestinos delgado y grueso	1 (240 mg) /1 2 (120 mg) /1 y 2 3 (60 mg) /1 y 2 4 (control)	No se aprecia ninguna lesión en los cortes histológicos.
Linfonodo mesentérico	1 (240 mg) /1 2 (120 mg) /1 y 2 3 (60 mg) /1 y 2 4 (control)	Deplección linfoide en los conejos de los lotes 2 y 3.
Testículo y útero	1 (240 mg) /1 2 (120 mg) /1 y 2 3 (60 mg) /1 y 2 4 (control)	No se aprecia ninguna lesión en los cortes histológicos.

Tabla 29b. Descripción de los hallazgos histológicos en las muestras de conejos silvestres tratados con diversas dosis de espinosad.

Encéfalo: No se aprecia ninguna lesión en los cortes histológicos.



Lote 1; Conejo 1

Lote 2; Conejo 1

Lote 2; Conejo 2

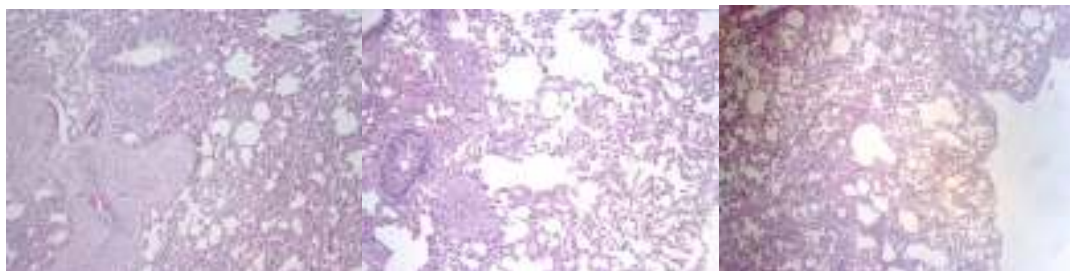


Lote 3; Conejo 1

Lote 3; Conejo 2

Lote 4; Conejo 1

Pulmón: Especialmente en los conejos de los lotes 3 y 4, se aprecian algunas áreas de atelectasia junto a zonas enfisematosas.



Lote 1; Conejo 1

Lote 2; Conejo 1

Lote 2; Conejo 2



Lote 3; Conejo 1

Lote 3; Conejo 2

Lote 4; Conejo 1

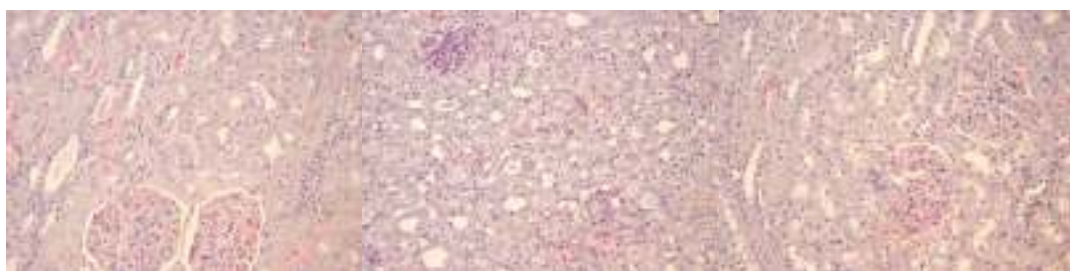
Riñón: En algunos conejos, se observan focos dispersos de infiltrado inflamatorio, como se aprecia en los lotes 1 y 3, y especialmente, en el conejo 2 del lote 3, con presencia de neutrófilos y necrosis celular y acúmulos de fragmentos celulares.



Lote 1; Conejo 1

Lote 2; Conejo 1

Lote 2; Conejo 2

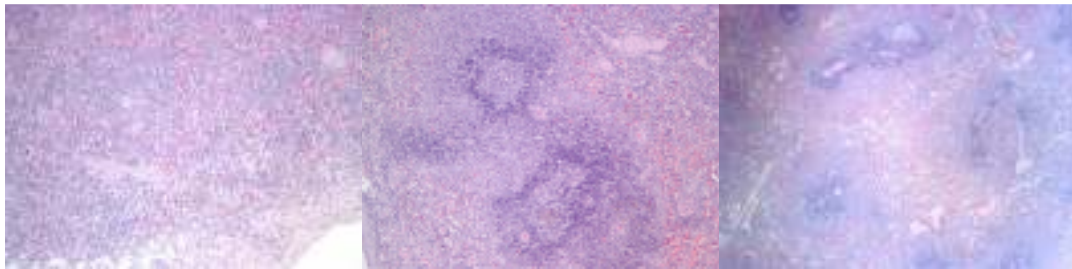


Lote 3; Conejo 1

Lote 3; Conejo 2

Lote 4; Conejo 1

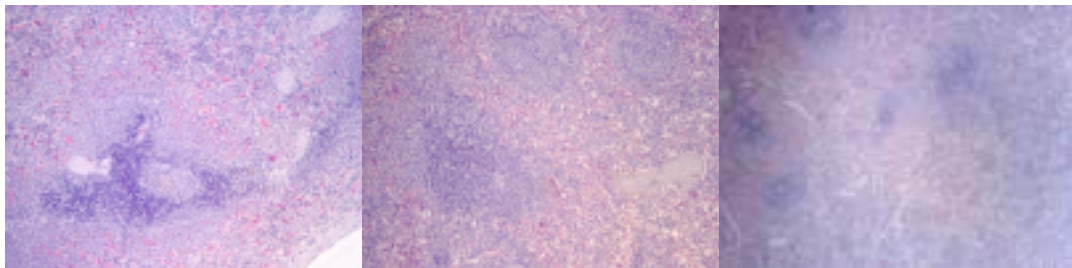
Bazo: En algunos conejos se aprecia deplección de la pulpa blanca, especialmente en los conejos 1 de los lotes 2, 3 y 4.



Lote 1; Conejo 1

Lote 2; Conejo 1

Lote 2; Conejo 2



Lote 3; Conejo 1

Lote 3; Conejo 2

Lote 4; Conejo 1

Hígado: Se observan focos necróticos coagulativos con infiltrado inflamatorio alrededor de los mismos, especialmente en los dos conejos del lote 2. Así mismo, se encuentran focos dispersos de infiltrado inflamatorio perivascular, especialmente en los conejos de los lotes 1 y 3.



Lote 1; Conejo 1

Lote 2; Conejo 1

Lote 2; Conejo 2

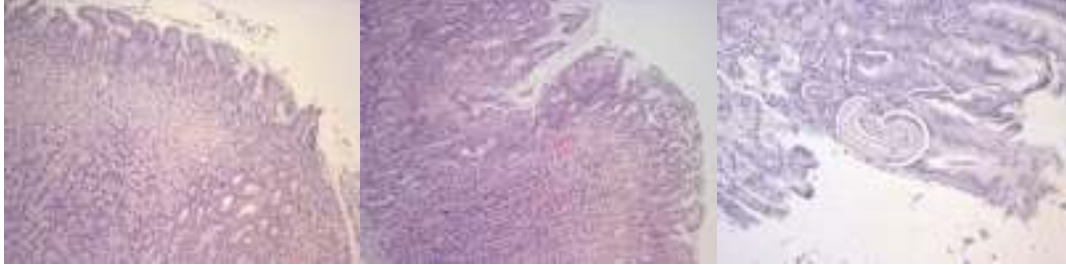


Lote 3; Conejo 1

Lote 3; Conejo 2

Lote 4; Conejo 1

Estómago: No se aprecian lesiones, pero sí la presencia de parásitos en la mucosa gástrica del conejo 2 del lote 2, con infiltrado inflamatorio a nivel de la submucosa.



Lote 1; Conejo 1

Lote 2; Conejo 1

Lote 2; Conejo 2



Lote 3; Conejo 1

Lote 3; Conejo 2

Lote 4; Conejo 1

Intestino delgado: No se aprecia ninguna lesión en los cortes histológicos.



Lote 1; Conejo 1

Lote 2; Conejo 1

Lote 2; Conejo 2

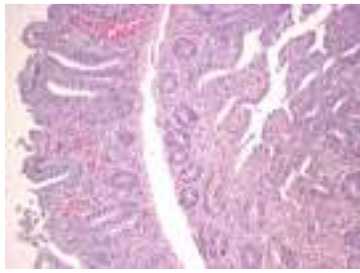


Lote 3; Conejo 1

Lote 3; Conejo 2

Lote 4; Conejo 1

Intestino grueso: No se aprecia ninguna lesión en los cortes histológicos.



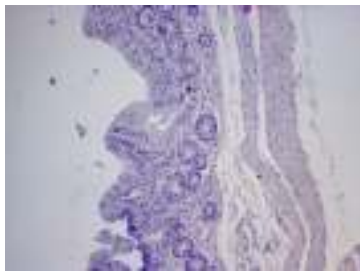
Lote 1; Conejo 1



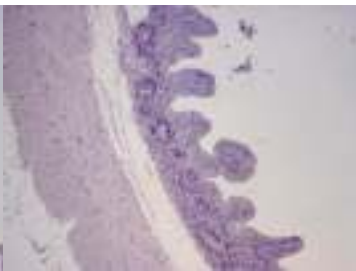
Lote 2; Conejo 1



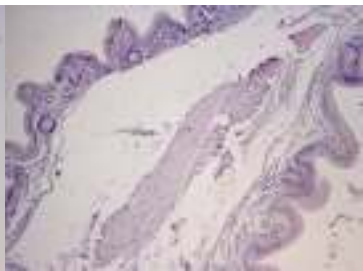
Lote 2; Conejo 2



Lote 3; Conejo 1

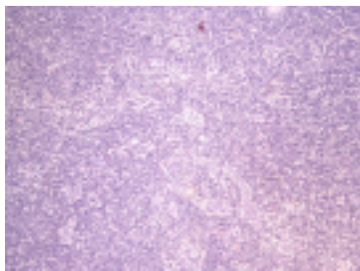


Lote 3; Conejo 2

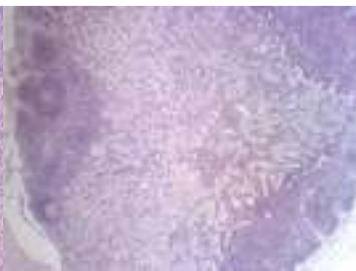


Lote 4; Conejo 1

Linfonodo mesentérico: Deplección linfoide en los conejos de los lotes 2 y 3.



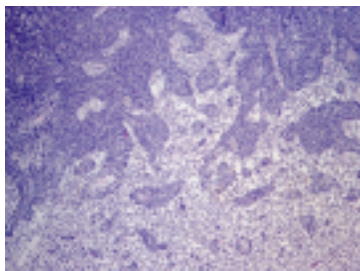
Lote 1; Conejo 1



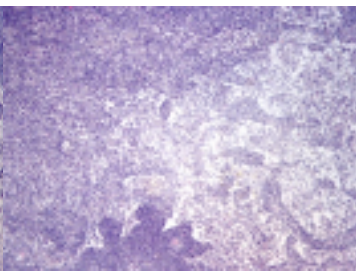
Lote 2; Conejo 1



Lote 2; Conejo 2



Lote 3; Conejo 1



Lote 3; Conejo 2



Lote 4; Conejo 1

Testículo: No se aprecia ninguna lesión en los cortes histológicos.



Lote 2; Conejo 2

Lote 3; Conejo 1

Lote 3; Conejo 2

Lote 4; Conejo 1

Útero: No se aprecia ninguna lesión en los cortes histológicos.



Lote 2; Conejo 1

A la vista de estos resultados, junto a la bibliografía revisada, podemos concluir que a las dosis y administración empleadas el espinosad no tiene ningún efecto indeseable en los conejos silvestres y, por lo tanto, puede ser utilizado como ixodicida para el control de la infestación por *H. lusitanicum* en condiciones de campo.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. En la vegetación de ecosistemas de clima mesomediterráneo pueden identificarse hasta cuatro especies de garrapatas, siendo los más abundantes los adultos de *Hyalomma lusitanicum* (95,65%). Otras especies minoritarias son *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus pusillus* y *Rhipicephalus bursa*.
2. Las principales especies cinegéticas de ecosistemas de clima mesomediterráneo (ciervo, conejo y jabalí) están parasitados por siete especies de garrapatas. Los ciervos son los hospedadores principales de los adultos de *H. lusitanicum*, si bien también se identificaron estadios inmaduros de esta especie, así como adultos de *R. bursa* y, esporádicamente, de *R. pusillus*, *I. ricinus* e *I. ventalloi*. Los conejos son los hospedadores principales de los estadios inmaduros de *H. lusitanicum*, de todo el ciclo de *Rhipicephalus pusillus* y *H. hispanica*, con parasitaciones puntuales por *R. bursa*, *D. marginatus* e *I. ventalloi*. Finalmente, en los jabalíes sólo se identificaron adultos de *H. lusitanicum*, *D. marginatus*, *R. pusillus* y *R. bursa*.
3. *H. lusitanicum* es la especie mayoritaria de garrapata exófila de ecosistemas de clima mesomediterráneos con al menos dos generaciones anuales. La generación temprana, que se inicia con los adultos que superan el invierno en el suelo y consiguen acceder a un hospedador en febrero, alimentándose y haciendo la puesta que dará lugar a la parasitación por larvas en conejos en abril y ninfas en mayo, y tras la muda contribuyen al aumento de adultos en suelo llegando a máximos en junio. Dadas las óptimas condiciones climáticas de esta segunda generación, los adultos acceden fácilmente a un hospedador, se alimentan, ovipositan y sus larvas parasitan a los conejos en julio y tras la muda a ninfas, en agosto. Algunos adultos resultantes podrán alimentarse en septiembre, pero la mayoría pasarán el invierno en el suelo.

4. La actividad de *H. lusitanicum* en la vegetación está directamente correlacionada con el aumento de temperatura y guarda una correlación inversa con la humedad, como corresponde a una especie perfectamente adaptada al hábitat.
5. Dada su elevado índice de abundancia en vegetación y de parasitación en animales de interés cinegético es necesario establecer un plan integrado de control de *H. lusitanicum* adaptado a su fenología. Así, se propone controlar la población de adultos en la vegetación en junio, la parasitación por adultos en ciervos en abril y mayo y la parasitación por inmaduros en conejos en julio y agosto.
6. El ácido oxálico puede ser una alternativa compatible con agricultura ecológica al control de adultos de *H. lusitanicum* en la vegetación mediante dos métodos de aplicación, a una concentración acuosa del 3% aplicado con una manguera a presión a 7-8 bares a razón de 266,6 ml/m² (400 l/1500 m²) o mediante ultra bajo volumen a una concentración acuosa al 10% a razón de 62,5 ml/m² (250 l/ 4000 m²) con reducciones esperadas a las 24 h de aplicación de 80,95 y 75,86%, respectivamente.
7. El espinosad por vía oral ha demostrado tener actividad ixodocida y antialimentaria, en infestaciones experimentales y naturales en conejo, con efecto residual de hasta 28 días.
8. La eficacia del espinosad está condicionada a la aceptación del producto por parte de los animales. Se ha demostrado que añadiendo 4,8 mg de espinosad por kg de trigo durante 13 días, la reducción de la parasitación por *H. lusitanicum* es del 55% en conejos silvestres en completa libertad.

7. RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

Las garrapatas son dañinas no solo por ser hematófagas sino por ser vectores de muchos microorganismos tanto de los animales como del ser humano, con importantes efectos sobre la salud de ambos, y grandes pérdidas económicas en la industria ganadera por la necesidad de aplicar productos químicos en la lucha frente a ellas. Debido a ello, el uso abusivo de los acaricidas ha contribuido al desarrollo de resistencia hacia dichos productos junto con un importante efecto nocivo en el medio ambiente al emplearse en algunas zonas de forma indiscriminada sobre los animales y sobre el ambiente. Debido a ello, es fundamental el desarrollo de nuevos productos que sean respetuosos con el medio ambiente y al mismo tiempo eficaces en el control de garrapatas. En la presente memoria hemos trabajado para descubrir nuevos productos que puedan ser clasificados como biopesticidas para el control de garrapatas, manteniendo siempre presente que el control debe basarse en el conocimiento de la fenología natural de la especie problema y a partir de éste, desarrollar un plan de control integrado que incluya las herramientas disponibles para actuar sobre los distintos hospedadores así como sobre el medio ambiente. El estudio se ha desarrollado en la finca “La Garganta”, localizada en Ciudad Real, (España) ejemplo típico de las zonas meso mediterráneas con grandes áreas de encinas, olivar ecológico, etc. Su fauna es exclusivamente cinegética: ciervo, corzo, cabra montés, jabalí, conejo y liebre, así como algunas especies en peligro de extinción: lince ibérico y águila imperial.

Como primer paso en el establecimiento del protocolo de control biológico e integrado de garrapatas se determinaron las especies presentes en la zona y su fenología. Para esto se llevaron a cabo muestreos en vegetación y en animales en seis áreas representativas de los ecosistemas presentes: olivar, encinar y eucaliptal. En los muestreos regulares de vegetación, con periodicidad mensual, se capturaron un total de 2.664 ejemplares, identificándose cuatro especies: *Hyalomma lusitanicum*, *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus bursa* y *R. pusillus*. *H. lusitanicum* fue la especie más abundante con un 95,65% del total de los ejemplares recolectados. Así mismo, en animales se recogieron un total de 9.401

garrapatas, identificándose siete especies diferentes. La dinámica estacional se determinó mediante el Índice de Abundancia de Garrapatas (IAG) y se estudió su relación con los principales parámetros meteorológicos, mostrando una correlación alta y positiva con la temperatura y alta pero negativa con la humedad ($P < 0,001$). En los animales *H. lusitanicum* también fue la especie mas abundante (73,76%), seguida de *R. pusillus*, *R. bursa*, *Haemaphysalis hispanica*, *D. marginatus*, *Ixodes ricinus* e *Ixodes ventralloi*. Una vez establecida la fenología de *H. lusitanicum* se diseñó un protocolo de trabajo para controlar las garrapatas tanto en el medio como sobre los animales.

Como medio de control en el medio ambiente se utilizó ácido oxálico (AO) en diferentes concentraciones desde el 6% al 0,5% aplicadas directamente en la vegetación mediante dos métodos, manguera y dispersión por ultra bajo volumen (UBV). Los mejores resultados se obtuvieron con manguera al 3% (80,95% de reducción de garrapatas) y con UBV al 10% (75,86%). Se considera éste último sistema como el más eficiente (más rápido y menor coste de aplicación) en espacios abiertos y de fácil acceso mientras que para zonas de difícil acceso a los tractores es preferible el empleo de mangueras.

El control de garrapatas en animales lo basamos en los conejos, principales hospedadores de los estadios inmaduros de *H. lusitanicum*. Realizamos unos ensayos preliminares con varios productos en condiciones de laboratorio y, finalmente, seleccionamos el espinosad que pareció tener mayor eficacia. Seguidamente, realizamos un estudio en condiciones de campo, en completa libertad, administrando espinosad en trigo (800 ml espinosad 48% en 80 kg) con alimentación natural alternativa en un período de máxima infestación de garrapatas en los conejos. Con este protocolo se consiguió una disminución en la infestación de garrapatas un poco mayor al 50%, especialmente en *H. lusitanicum* (55%).

En conclusión se puede decir que *H. lusitanicum* presenta al menos dos generaciones diferentes al año y que el AO aplicado en la vegetación así como el espinosad en animales representaron excelentes alternativas para su control, congruentes con la gestión ecológica en la zona de estudio.

ABSTRACT

Ticks are harmful not only due their feeding behavior of sucking blood, but to their ability to transmit pathogens to animals and humans with significant consequences for animal and human health. They are also a big economic burden to the cattle industry due the necessity to reject them by expensive chemical products. The excessive use of drugs caused the development of resistant tick and is damaging the environment. Because of that, there is an urgent necessity for the development of new acaricidal substances that are environmentally friendly. Following that direction we studied new substances that can be classified as biopesticides for tick control, always keeping in mind that Integrated Pest Management includes control on both hosts and environment. The deep knowledge of tick phenology will improve the treatment schedules. This study was performed in “La Garganta”, a private hunting preserve located in Ciudad Real, where they maintain exclusive game species such as deers, road deers, ibex, wild boards and rabbits, as well as endangered species such as the Iberic linx and the Imperial eagle. There is a variety of vegetation, with organic olive cultives being the principal one.

The first stage in our integrated tick control protocol was to find which ticks species were present in the area and determine their phenology. In order to achieve that, we took samples of ticks on animals and vegetation from six different areas highly representative of the ecosystems on the farm, including eucalyptus forest, evergreen oak forest and organic olives trees. From the vegetation sampling we obtained 2,664 ticks, which consisted of four species: *Hyalomma lusitanicum*, *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus bursa* and *R. pusillus*. The most abundant tick was *H. lusitanicum* with 95% of the total collected. From the animal sampling we obtained 9,401 ticks, representing seven different species: *H. lusitanicum* (73.76%), followed by *R. pusillus*, *R. bursa*, *Haemaphysalis hispanica*, *D. marginatus*, *Ixodes ricinus* e *Ixodes ventralloi*. Again the most abundant tick was *H. lusitanicum*. With this data we proceeded to establish the phenology by the Tick Abundance Rate index (TAR) on all the sampling areas. The results showed a high and positive correlation between humidity and TAR

but negative correlation between temperature and TAR ($P < 0,001$). With this information, and once the phenology of *H. lusitanicum* was established, we designed a tick control protocol on both animals and vegetation.

On the environment (vegetation) we essayed OA in different concentration ranging from 6% to 0.05. The methods of application were either putting it directly on the vegetation by hose, or by ultra low volume spreading with a (ULV) machine. OA at 3% applied by hose (80.95% tick reduction) and OA at 10% applied by ULV (75.86%) showed the best results. The latter is the most efficient (faster and lower cost) for open field areas that are easy to reach, while for rocky and difficult to access areas the hose method proved to be the best option.

For tick control on animal hosts we targeted rabbits as the main host of immature stages for *H. lusitanicum*. Previously we performed several assays in laboratory conditions testing several products. We selected spinosad for next stages as it showed the best efficacy. Finally, we performed an assay under field conditions. We administrated spinosad on wheat (800 ml spinosad 48% in 80 kg) combined with natural feeding during the peak of tick infestation on rabbits. With this protocol we achieved almost 50% reduction, especially on *H. lusitanicum* (55%).

In conclusion, we established that there are at least two *H. lusitanicum* generations during a year and both products -OA in vegetation and spinosad on animals - are excellent alternative control substances that are congruent with organic management in the study zone.

8. BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Shafy, S., Zayed, A.A., 2002. In vitro acaricidal effect of plant extract of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae). Vet. Parasitol. 106, 89-96.
- Ahmed, B. M., Taha, K. M., El Hussein, A. M., 2011. Life Cycle of *Hyalomma annatolicum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) fed on rabbits, sheeps and goats. Vet. Parasitol. 177, 353-358.
- Alahmed, A. M., Kheir, S.M., 2003. Lyfe Cicle and Survival of *Hyalomma dromedarii* (Acari. Ixodidae) Under Laboratory Conditions. Agriculture and Marine Science 8, 11-14.
- Aliano, N. P., 2008. An Investigation of Techniques for Using Oxalic Acid to Reduce Varroa Mite Population in Honey Bee Colonies and Package Bees. Entomology department of Dissertations and Students Research. University of Nebraska. Lincol. Tesis Doctoral.
- Aliano, N.P., Ellis, M.D., 2009. Oxalic acid: a prospective tool for reducing Varroa mite populations on package bees. Exp. Appl. Acarol. 48, 303-309.
- Allan, B. F., 2009. Influence of Prescribed Burns on the Abundance of *Amblyoma americanum* (Acari: Ixodidae) in the Missouri Ozarks. J. Med. Entomol. 46, 1030-1036.
- Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Rosario-Cruz, R., Jongejan, F., de la Fuente, J., 2010. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate preteactive antigens for the control of cattle tick infestation. Parasitol. Res. 106, 471-479.
- Álvarez, V., Loaiza, J., Bonilla, R., Barrios, M., 2008. Control *in vitro* de garrapatas (*Boophilus microplus*: Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. Rev. Biol. Trop. 56, 291-302.

- Ángel-Sahagún, C. A., Lezama-Guitierrez, R., Molina-Ochoa, J., Pescador-Rubio, A., Skoda, S. R., Cruz-Vázquez, C., Lorenzoni, A. G., Galindo-Velasco, G., Fragoso-Sánchez, H., Foster, J. E., 2010. Virulence of mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitasea) upon *Rhipicephalus= Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larva tick density under field conditions. *Vet. Parasitol.* 170, 278-286.
- Apanaskevich, D. A., Santos-Silva, M. M., Horak, I. G., 2008. The genus *Hyalomma* Kock, 1884. IV. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) lusitanicum* Koch, 1884 and the adults of *H. (E) franchinii* Tonelli Rondelli, 1932 (Acari: Ixodidae) with a first description of its immature stages. *Folia Parasitologica* 55, 61-74.
- Apiservices.http://www.apiservices.com/_menus_us/index.htm?menu.htm&0
Consultada en mayo de 2013.
- Bahiense, T. C., Fernández, E. K., Bittencourt, V. R., 2006. Compatibility of the fungus *Metharizium anisopliae* and deltametrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Vet. Parasitol.* 5, 3-4.
- Barandika, J. F., Hurtado, A., García-Sanmartín, J., Juste, R. A., Anda, P., García Pérez, A. L., 2007. Prevalence of Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Questing Adult Ticks from Northern Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 8, 829-835.
- Barandika, J. F., Hurtado, A., Juste, R. A., García-Pérez, A. L., 2010. Seasonal dynamics of *Ixodes ricinus* in a 3-year period in northern Spain: first survey on the presence of tick-borne encephalitis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 1027-35.
- Barandika, J. F., Olmeda S. A., Casado-Nistal M. A., Hurtado A., Juste R. A., Valcárcel F., Anda, P., García Pérez, A. L., 2011. Differences in questing tick species distribution between Atlantic and continental climate regions in Spain. *J. Med. Entomol.* 48, 13-9.

- Barker, S.C., Murell, A., 2002. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. *Exp. Appl. Acarol.* 28, 55-68.
- Barker, S. C., Murel, A., 2008. Systematic and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Ticks Biology, Disease and Control*, edited by Alan S. Bowman and Pat Nutall. Cambridge University Press.
- Barton, T. R., Harris, M. P., Wanless, S., Elston, D. A., 1996. The activity periods and life-cycle of the tick *I. uriae* in relation to host breeding strategies. *Parasitol.* 112, 571-580.
- Basco, P. I., Carballedo, A. D., Cota-Guajardo, S. C., Olmeda-García, A. S., Valcárcel-Sancho, F., 2008. Estudio de control biológico de garrapatas en la finca "La Garganta". *RCCV.* 2, 73-84.
- Bermúdez, S., Miranda, C., 2010. Entomología médica, colección zoológica "Dr. Eustorgio méndez" Ing. Gilberto De León (Administración de Sistemas) Instituto conmemorativo Gorgas de estudios de la salud http://www.gorgas.gob.pa/index.php?option=com_content&view=article&id=60&lang=es. Consultada en marzo de 2010.
- Biondi, A., Mommaerts, V., Smagghe, G., Viñuela, E., Zappalà, L., Desneux, N., 2012. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Manag. Sci.* 68, 1523-36.
- Bissinger, B. W., Apperson, C. S., Sonenshine, D. E., Watson, W., Roe, R.M., 2009. Efficacy of the new repellent BioUD® against three species of Ixodid ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 48, 239-250.
- Bowman, A. S., Nutall, P., 2008. *Ticks Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Bowman, D. D., 1999. *Georgi's Parasitology for veterinarians*. Saunders company. 7ma Edición. USA. 477 pp.

- Breslin, W. J., Marty, M. S., Vedula, U. V., Liberacki, A. B., Yano, B.L., 2000. Developmental toxicity of Spinosad administered by gavage to CD and New Zealand white rabbits. *Food Chem. Toxicol.* 38, 1103-1112.
- Brito, L. G., Barbieri, F. S., Rocha, R. B., Oliveira, M. C. S., Ribeiro, D. S., 2011. Evaluation of the Efficacy of Acaricides Use to Control the Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*, in Dairy Herds Raised in the Brazilian Southwestern Amazon. *Vet. Med. Int.* 2011, 6-12.
- Butler, J. F., Camino, M. L., Pérez, T. O., 1979. *Boophilus microplus* and the fire ant *Solenopsis germinata*. In recent Advances in Acarology. New York: Academic. 469-472.
- Canales, M., Pérez de la Lastra, J. M., Naranjo, V., Nijhof, A. M., Hope, M., Jongejan, F., de la Fuente, J., 2008. Expression of recombinant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol.* 8, 14. 1-12.
- Canales, M., Almazán, C., Naranjo, V., Jongejan, F., de la Fuente, J. 2009. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnology.* 29, 9. 1-8.
- Castellá, E. J., 1998. El género *Teutana* (Arachnida: Therididae) como depredador natural de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: ixodidae). Memorias del IV Simposio Ibérico Sobre Ixodoidea e Enfermedades Transmissíveis. Sétubal, Portugal.
- Cessna, G. S., Sears, V. E., Dickman, M.B., Low, P. L., 2000. Oxalic Acid, a Pathogenicity Factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, Suppresses the Oxidative Burst of the Host Plant. *American Society of Plant Physiologist. The Plant Cell.* 12, 2191-2199.
- Cetin, H., Cilek, J. E., Oz E., Aydin, L. Deveci, O., Ynikoglu, A., 2009. Comparative efficacy of Spinosad with conventional acaricides against

- hard and soft tick populations from Antalya Turkey. Vet. Parasitol. 163, 101-104.
- Chandler, D., Davidson, G., Pell, J. K., Ball, B.V., Shaw, K., Sunderland, K.D., 2000. Fungal biocontrol of Acari. Biocontrol Sci. Technol. 10, 357–384.
- Chen, Z., Li, J., Liu, Z., Yang J., Yin, H., 2012. The life cycle of *Hyalomma rufipes* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. Exp. Appl. Acarol. 56, 85-92.
- Chen, Z., Ju, Z., Yang, J., Zheng H., Liu, Z., 2009. The life cycle of *Hyalomma asiaticum kozlovi*, Olenov 1931, (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. Vet. Parasitol. 160, 134-137.
- Cobb, S., 1942. Tick parasites on Cape Cod. Science. 95, 503.
- Cordero del Campillo, M., Castañón Ordeñez, L., Reguera Feo, A., 1994. Índice catalogo de zooparásitos ibéricos. Universidad de León. Secretariado de publicaciones, 579 pp.
- Coronado, A., 2008. *Ixodiphagus hookeri* Howard, 1907 (Hymenoptera: Encyrtidae) in the Brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) in Venezuela. Entomotropica. 21, 61-64.
- Coronado, A., Mujica, F., Forlando, M., Suarez., C. 2008. *Ixodiphagus hookeri* in *Rhipicephalus sanguineus* nymphs in Venezuela. Memorias del VI International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens. Buenos Aires, Argentina.
- CTCB. Centro Tecnológico de Control Biológico. 2009. <http://www.controlbiologicochile.cl/content/view/58/76/>. Consultada en mayo de 2009.
- Davey, R. B., George, J. E., Snyder, D. E., 2001. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. Vet. Parasitol. 99, 41-52.

- Davis, G. E., 1951. Parthenogenesis in the Argasid Tick *Ornitodhorus moubata* (Murray, 1887). J. of Parasitol. 37, 99-101.
- De la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J. M., Kocan, K. M., Willadsen, P., 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. Animal Health Research Reviews 8, 23-28.
- De la Fuente, J., Kocan, J. M., 2006. Strategies for development of vaccines for control of Ixodid ticks species. Parasite Immunology. 28, 275-283.
- De la Fuente, J., Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Estrada-Peña, A., Almazán, C., Kocan, K.M., Martín, M.P., Gortázar, C., 2004. Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from European wildboar (*Sus scrofa*) and Iberian reed deer (*Cervus Elaphus hispanicus*) in central Spain. Eur J Wildl Res 50, 187-196.
- De Oliveira, M. M. C., de Azevedo Prata, M.C., Furlong, J., Faza, A.P., Silva Mendes, A., Andaló, V., Moino-Junior, A., 2010. *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitol. Res. 106, 821-826.
- Demas, F. A., Hassanali, A., Mwangi, E.N., Kunjeku, E. C., Mabveni, A. R., 2000. Cattle and *Amblyomma variegatum* odors used in host habitats and host finding by the tick parasitoid, *Ixodiphagus hookeri*. J. Chem. Ecol. 26, 1079-1093.
- Demas, F. A., Mwangi, E. N., Hassanali, A., Kunjeku, E. C., Mabveni, A.R., 2002. Visual Evaluation and Recognition of Host by the Tick Parasitoid, *Ixodiphagus Hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae). J. Insect Behavior 15, 477-494.
- Derrick, E.H., 1937. Q fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. Med. J. Aust. 11, 281-299.

- Dinalva, A. M., Monterio, A. C., Simi, L. D., Moraes Campaio, A. A., 2009. Susceptibility of adult and larval starges of the horn fly, *Haematobia irritans*, to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under field conditions. Vet. Parasitol. 166, 136-143.
- Dreyer, K., Fourie, L. J., Kok D. J., 1997. Predators of livestock ticks by chickens as a tick control method in a resource –poor urban environment. Onderstepoort J. Vet. Res. 64, 237-276.
- DOF, Diario Oficial de la Federación, 2012. Acuerdo por el que se establece la campaña nacional para el control de la garrapata *Boophilus microplus*. DOF: 10/09/2012.
- ELGhali, A., Hassan, S. M., 2010. Drop-off rhythms and survival periods of *Hyalomma dromedarii* (Acari, Ixodidae) fed on camels (*Camelus dromedarius*) in the Sudan. Vet. Parasitol. 170, 302-306.
- EMA, The European Agency for the Evaluation of Medical Products. EMA/MRL/Final. December 2003. Oxalic Acid, Sumary Report.
- EMA, The European Agency for the Evaluation of Medical Products. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. EMA/CVMP/499406/2010. 10 December 2010.
- EMA, The European Agency for the Evaluation of Medical Products. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. EMA/CVMP/499406/2010.http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/veterinary/002233/WC500110654.pdf. Consultada en Agosto 2011
- EPA, U.S. Environmental Protection Agency. 1992. R.E.D Facts. Oxalic acid. EPA, Washington, DC.
- EPA, U.S. Environmental Protection Agency. 2005. A Comparison of the Results of Studies on Pesticides from 12-or 24-Month Dog Studies with Dog Studies of Shorter Duration. EPA, Washington, DC. Consultada en mayo de 2010.

- EPA, U.S. Environmental Protection Agency. 2009. EFED Risk Assessment for the Proposed IR-4 Use of the Spinosad product Entrust® on Pomegranate and Dates, PC Code: 110003 DP Barcodes: 358851 and 358852. Washington, DC. Consultada en agosto de 2011.
- EPA, Environmental Protection Agency (USA). 2010. <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/whatarebiopesticides.htm>. Consultada en Junio de 2012.
- Espinosa-Montaña, L. G., Guzman-Novoa, E., 2007. Eficacia de dos acaricidas naturales, ácido fórmico y timol, para el control del ácaro *Varroa destructor* de las abejas (*Apis mellifera* L.) en Villa Guerrero, Estado de México, México. Vet. Méx., 38, 21-15.
- Estrada-Peña, A., 1994. Las Garrapatas en España: Introducción. Editorial Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. España. 88 pp.
- Estrada-Peña, A., Martínez, J. M., Sánchez-Acedo, C., Quílez, J., del Cacho, E., 2004a. Phenology of the tick *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). Med.Vet. Entomol. 18, 387-397.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J. L., Walker, A. R., 2004b. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: a guide to identification of species. University of Zaragoza, España. 131 pp.
- Estrada-Peña, A., Sánchez-Acedo, C., 1989. Presencia en España de *Hunterellus hookeri* Howard, 1907, como parásito de *Haemaphysalis punctata* (Acarina: Ixodidae). Rev. Iber. Parasitol. 49, 183-184.
- FAO. 1992. Epizootiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. Santiago de Chile. FAO regional office for Latin America and the Caribbean 41 pp.
- FAO, Agriculture Department Food and Agriculture Organization. 2002. Tick control in the Caribbean. World Food Summit.

- FDA, Food and Drug Administration., 2008. US Department of Health & Human Services. Animal & Veterinary. Comfortis ® and ivermectin interaction safety warning notification. June 24, 2008. . <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm047942.htm>. Consultada en mayo 2009.
- Feldman-Muhsam, B., 1964. Laboratory colonies of *Rhipicephalus*. Bull. Wld. Hlth. Org. 31, 587-589.
- Feldman-Muhsam, B., 1985. Observations on the mating behaviour of ticks, en Sauer, J.R., Hair, J.A., Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks. Horwood. Oklahoma. USA. 510 pp.
- Fernandes, E. K. K., Bittencourt, V. R. E. P., 2008. Entomopathogenic fungi agasint South American tick species. Exp. Appl. Acarol. 46, 71-93.
- Fernandes, E. K. K., Bittencourt, V. R. E. P., Roberts, D. W., 2012. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. Experimental Parasitol. 130, 300-305.
- Foldvari, G., Valcárcel, F., García Romero, C., Corchero, J., Olmeda, A. S., 2000. Parasitación de *Rhipicephalus bursa* por larvas de avispa del género *Ixodiphagus* (Hymenoptera, Encyrtidae) Memorias del V Simposium Ibérico Sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas. Madrid, España.
- Freitas-Ribeiro, G. M., Vasconcelos, V. O., Furlong, J., Dolinski C., 2009. Evaluation of the efficacy of strains of *Steinernema carpocapsae* Santa Rosa and ALL (Sternernematidae: Rhabditida) to control engorged female *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). Parasitol Res. 104, 1203-1206.
- Gállego-Berenguer, J., 1996. Manual de Parasitología: Morfología y biología de los parásitos de interés veterinario. Universidad de Barcelona. Barcelona. España. 516 pp.

- García-Fernández, P., Hueli, L.E., Viseras-Alarcón, J., 1996. Encuesta epizootiológica de la theileriosis bovina por *Theileria annulata* en el toro de lidia. *Medicina Veterinaria*. 13, 348-352.
- García Romero, C., Valcárcel, F., Rojo Vázquez., F. A., 1997. Influence of climate on pasture infectivity of ovine *Trichostrongyles* in dry pastures. *J. Vet. Med. series B*. 44, 437-443.
- García-Rojo, B., 2011. Evaluación del espinosad en el control de la infestación por garrapatas del género *Hyalomma*. Trabajo Fin de Máster de Investigación en Ciencias Veterinarias, Universidad Complutense de Madrid. 71 pp.
- George, D.R., Guy, J.H., Arkle, S., Harrington, D., De Luna, C., Okello, E.J., Shiel, R.S., Port, G., Sparagano, O.A.E., 2008a. Use of Plant-derived Products to Control Arthropods of Veterinary Importance: A Review. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 23-26.
- George, J. E., Pound, J. M., Davey, R. B., 2008b. Acaricides for controlling ticks on cattle and the problem of acaricide resistance. En Bowman, A.S., Nutall, P.A., *Ticks biology, disease and control*. Cambridge University Press. 506 pp.
- Gern, L., Morán-Cadenas, F., Burri, C., 2008. Influence of some climatic factors on *Ixodes ricinus* tick studied along altitudinal gradients in two geographic regions in Switzerland. *Int. J. Med. Microbiol.* 298 Supplement 1, 55-59.
- Gil-Collado, J., Guillén, J. L., Zapatero, L. M., 1979. Claves para la identificación de los ixodoidea españoles (adultos). *Rev. Iber. Parasitol.* 39, 107-111.
- Gil-Collado, J., 1961. *Insectos y acáros de los animales domésticos*. Salvat Editores S. A. España. 248 pp.

- Gindin, G., Samish, M., Zangi, G., Mishoutchenko, A., Galzer, I., 2003. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. *Exp. Appl. Acarol.* 28, 283-288.
- Ginsberg, H. S., Lebrun, R. A., Heyer, K., Zhioua, E., 2002. Potential nontarget effects of *Metahizium anisopliae* (Deuteromycetes) used for biological control of ticks (Acari: Ixodidae). *Env. Entomol.* 31, 1191-1196.
- Ghosh, S., Azhahianambi, P., Yadav, M.P., 2007. Up coming and future strategies of tick control: review. *J. Vect. Borne Dis.* 44, 79-89.
- Ghosh, S., Ray, D., Vanlahmuaka, D., Das, G., Sing, N. K., Sharma, J. K., Azhahianambi, P., 2008. Progress in development of vaccine against *Hyalomma anatolicum anatolicum* – Indian Scenario. *Vaccine.* 6, 40-47.
- Gladney, W.J., Ernst, S.E., Grabbe, R.R., 1974. The aggregation response of the Gulf Coast tick on cattle. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 6, 750–752.
- Gopal, M., Gupta, A., Arunachalan, V., Magu, S. P., 2007. Impact of azadirachtin, an insecticidal allelochemical from neem on soil microflora, enzyme and respiratory activities. *Bioresource technology.* 98, 3154-3158.
- Gregor, A., Planic, I., 2004. Dynamics of Falling *Varroa* Mites in Honeybees (*Apis mellifera*) Colonies Following Oxalic Acid Treatments. *Acta Vet. Brno.* 73, 358-391.
- Harwood, R.F., James, M.T., 1987. *Entomología médica y veterinaria.* Limusa, México. 615 pp.
- Horak, I.G., Camicas, J.L., Keirans, J.E., 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp. Appl. Acarol.* 28, 27-54.

- Hoffman, A., 1988. Animales desconocidos, relatos acarológicos. Fondo de cultura económica. SEP-CONACYT. México. 129 pp.
- Hope, M., Jiang, X., Gough, J., Cadogan, L., Josh, P., Jonsson, N., Willadsen, P., 2010. Experimental vaccination of sheep and cattle against tick infestation using recombinant 5'-nucleotidase. *Parasite Immunol.* 32, 135-142.
- Hu, R., Hyland, K.E., 1997. Prevalence and seasonal activity of the wasp parasitoid, *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae) in its tick host, *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Syst. Appl. Acarol.* 2, 95-100.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitol.* 129, 3-14.
- Jonsson, N., 2004. Integrated control programs for ticks on cattle: An Examination of some possible components. FAO Animal Production and Health Paper. School of Veterinary Science, University of Queensland, Australia. 82 pp.
- Jonsson, N. N., Hope, M., 2007. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 146, 193-198.
- Jonsson, N. N., Miller, R.J., Kemp, D.H., Knowles, A., Ardila, E.A., Verral, R.G., Rothwell, J.T., 2010. Rotation of treatments between spinosad and amitraz for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations with amitraz resistance. *Vet. Parasitol.* 169, 157-164.
- Kaaya, G.P., Hassan, S., 2000. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Exp. Appl. Acarol.* 24, 913-926.
- Kaaya, G.D., Saxena, R.C., Gebre, S., 2007. The potential of neem products for control of economically-important African ticks. *Biotechnology Research Asia.* 4, 95-104.

- Knap, N., Durmisi, E., Saksida, A., Korva, M., Petrovec, M., Avsic-Zupanc, T., 2009. Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* tick in Slovenia. *Vet. Parasitol.* 164, 275-281.
- Kirkland, B.H., Cho, E., Nemat, O. K., 2004. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidea) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological control.* 31, 414-421.
- Kirkland, B.H., Asma, E., Nemat, O.K., 2005. Oxalic Acid as a Fungal Acaricidal Virulence Factor. *J. Med. Entomol.* 42, 346-351.
- Kiss, T. D. C., Spinu, M., 2012. Tick prevention at acrossroad: New and renewed solutions. *Vet. Parasitol.* 6, 187(3-4): 357-366. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.02.010.
- Komplen, J. S., Black, W.C 4th., Keirans, J.E., Oliver, J.H. Jr. 1996. Evolution of Ticks. *Ann. Rev. Entomol.* 41.141-61.
- Kumar, A., Rajat, G., Yadv, C.L., Vatsya, S., Kumar, R.S., Sugumar, P., Chandran, D., Mangamoorib, L.N., Bedkar, S.N., 2009. Immune responses against recombinant tick antigen Bm95, for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick in cattle. *Vet. Parasitol.* 165, 119-124.
- Lacey, L.A., 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J. of the American Mosquito Control Association.* 23, 133-137.
- Landau, S. Y., Provenza., F.D., Gadmer, D.R., Pfister, J.A. Knopple, E.L., Peterson, C., Kababya, D., Needham, G.R., Villalba, J.J., 2009. Neem-tree (*Azadirachta indicus* Juss) extract as a feed additive agasint the American dog tick (*Dermacentor variabilis*) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 165, 311-317.

- Makeri, H.K., Maikai, V.A., Nok, J.A., 2007. Effect of topical application of neem seed (*Azadirachta indica*) extract on sheep infested with *Amblyomma variegatum*. African J. of Biotechnol. 6, 232-237.
- Maranga, R. O., Kaaya, G.P., Hassanali, A., 2005. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (ixodidae) in relation to seasonal changes. Mycopathologia. 159, 527-32.
- Marquez-Jimenez, F.J., Hidalgo Pontiveros, A., Contreras Chobas, F., Rodriguez Liébanas, J.J., Muniani-Ezcurra, M.A., 2005. Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de 92 microorganismos patógenos en España. Enf. Infecc. Microbiol. Clin. 23, 94-102.
- Márquez Luna, J., 2005. Técnicas de colecta y preservación de insectos. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa. 37, 385-408.
- Márquez-Jimenéz, F. J., Hidalgo-Pontiveros, A., Contreras-Chova, F., Rodríguez-Liébanas, J. J., Muniain-Ezcurra, M. A., 2005. Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. Enf. Infecc. Microbiol. Clin. Vol. 23. Núm. 02.
- Mauleon, H., Barre, N., Panoma, S., 1993. Pathogenicity of 17 isolates of entomopathogenous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for ticks *Amblyomma variegatum* (Fabricius), *Boophilus microplus* (Canestrini) and *Boophilus annulatus* (Say). Exp. Appl. Acarol. 17, 831-838.
- Mayes, M. A., Thompson, G.D., Husband, B., Miles, M. M., 2003. Spinosad Toxicity to Pollinators and Associated Risk. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 179, 37-71.
- Megaw, M. W. J., 1978. Virus-like particles pathogenic to salivary glands of the tick *R. Boophilus microplus*. Nature 271, 483-84.

- Meike, P. T., Colleti, S.L., Fisher, M.H., Wyvrat, M.J., Shih, T.L., de Montingy, M.P., Ostlind, D.A., Fink, D., Drag, M., Shcmat, D.M., Wesley, Z., Shoop, L., 2009. Discovery of the Development Candidate *N-tert-Butyl Nodulisporamide*: A safe and Efficacious Once Monthly Oral Agent for the Control of Flies and Ticks on Companion Animals. *J. Med. Chem.* 52, 3505-3515.
- Merck, Co., Ltd publicado en sociedad con Merial Ltd. 2008. Consultada en Agosto de 2010. <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/72120.html>
- Merino, F.J., Nebreda, T., Serrano, J. L., Fernández-Soto, P., Encinas, A., Pérez-Sánchez, R., (2005). Tick species and tick-borne infections identified in population from a rural area of Spain. *Epidemiol. Infect.* 133, 943-949.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Registro de productos fitosanitarios. Consultada en marzo de 2013. <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/medios-de-roduccion/productos-fitosanitarios/registro/productos/proexi.asp?e=0&cod=&nom=Madex>.
- Miñarro, M., Dapena, E., 2000. Control de *Cydia pomonella* (L) Lepidoptera: Tortricidae) con granulovirus y confusión sexual en plantaciones de Manzanos de Asturias. *Bol. San. Veg. Plagas.* 26, 305-316.
- Mwangi, E. E., Hassan, S. M., Kaaya, G. P., Essuman, S., 1997. The impact of *Ixodiphagus hookeri*, a tick parasitoid, on *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in a field trial in Kenya. *Exp. Appl. Acarol.* 21, 117-126.
- Navon, A., 2000. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. In *Bacillus thuringiensis*. Application in Agriculture. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 529 pp.
- Nanetti, A., Büchler, R., Charriere, J.D., Frieds, I., Helland, S., Imdorf, A., Korpela, S., Kristiansen, P., 2003. Oxalic acid treatments for varroa control (review). *Apiacata* 38, 81-87.

- NCBI. National Center for Biotechnology Information. NCBI Taxonomy browser. 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=ixodidae>. Consultada en mayo de 2012.
- Olmeda A.S. Transmisión experimental de *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold 1870) por *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806). 1992. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España. 193 pp.
- Olmeda A. S., Casado Nistal M. A., Toledo A., Meana A., Valcárcel F. 2005. Global Study on the presence and seasonal activity of ticks in Madrid and Castilla-La Mancha. IX Congreso Ibérico de Parasitología. Coimbra.
- Oliver, J. H. Jr., 1986. Induction of oogenesis and oviposition in ticks en Sauer, R., Hair, A., Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks. Oklahoma. USA. 510 pp.
- Ordoñez-Manriquez, M. J., Gaxiola-Camacho, S. M., Portillo-Loera, J. J., Castro del Campo N., Cota-Guajardo, S.C., 2010. Resistencia de la garrapata *B. microplus* a coumafos y deltametrina en el municipio de Culiacán, Sinaloa. Tesis de maestria. Universidad Autónoma de Sinaloa. México.
- OIBC International Organization for Biological Control. OILB Organización Internacional para la Lucha Biológica. <http://www.iobc-global.org/index1.html>. Consultada en Marzo de 2013.
- Ouhelli, H., Pandey, V.S., 1984. Development of *Hyalomma lusitanicum* under laboratory conditions. Vet. Parasitol. 15, 57-66.
- Padgett, K. A., Casher, L. E., Stephens, S. L., Lane, R. S., 2009. Effect of Prescribed Fire for Tick Control in California Chaparral. J. Med. Entomol. 46, 1138-1145.
- Parola, P., Didier, R., 2001. Ticks and tick borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infec Dis. 32, 897-928.

- Patarroyo, J. H., Portela, R. W., De Castro, R. O., Couto-Pimentel, J., Guzman, F., Patarroyo, M. E., Vargas, M. J., Prates, A. A., Días Mendes, M. A., 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). Vet. Immunol. Immunopathol. 88, 163-172.
- Peconick, A. P., Sossai, S., Girão, F.A., Rodrigues, M. Q. R. B., Souza, C.H., Guzman, S.F., Patarroyo, Q.A.M., Vargas, V.M., Patarroyo, J.M., 2008. Synthetic vaccine (SBm 7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. Exp. Parasitol. 119, 37-43.
- Pérez Sánchez, J.L., 2006. Control Integrado de la Varroosis Mediante Terapia Farmacológica con Productos Compatibles con la Apicultura Ecológica. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España. 193 pp.
- Perret, J. L., Guigoz, E., Rais, O., Gern, L., 2000. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). Parasitol. Res. 86, 554-7.
- Perret, J.L., Guerin, P.M., Diehl, P. A., Vlimant, M., Gern, L., 2003. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. The J. of Exp. Biol. 206, 1809-1815.
- Polar, P., Moore, P., Moses, D., Kaio, T. K., Ramsubha, A., 2008. Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks; overcoming the challenges. Exp. Appl. Acarol. 46, 119-148.
- Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Flint, S. D., Anderson, A. J., Roberts, D. W., 2004. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on artificial and natural substrates. J. Invertebrate Pathol. 87, 77-83.

- Rees, H.H., 2008. Endocrinology of tick development and reproduction. En Bowman, A.S., Nutall, P.A., Ticks biology, disease and control. Cambridge University Press. 506 pp.
- Rehacek, J., Sutakova, G., 1989. Virus-like particles in *Dermacentor reticulatus* ticks. Acta Virol. 33, 557-81.
- Reis-Menini, C.M., Prata, M.C.A., Furlong, J., Silva, E.R., 2008. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitol. Res. 103, 1391-1396.
- Reis, R., Éverton, C.S., Fernández, K.K., Vânia, R., Bittencourt, E.P., 2008. Fungi Formulations to Control *Rhipicephalus sanguineus* Engorged Females. Animal Biodiversity and Emergency Disease: Ann. N. Y. Acad. Sci. 1149, 239-241.
- Rodríguez Diego, J. G., Arece, J., Olivares, J.L., Roque, E., 2009. Origen y evolución de arthropoda. Salud Animal 31, 137-142.
- Sauka, D.H., Benintende, G.B., 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas Revista Argentina de Microbiología. 40, 124-140.
- Salafsky, B., He, Y., Li, J., Shibuya, T., Ramaswamy, K., 2000. Short report: Study on the efficacy of a new long-acting formulation of N, N-diethyl-m-Toluamide (DEET) for the preention of tick attachment. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62, 169-172.
- Samish, M., Alekseev, E., 2001. Arthroprods as Pedrators of Ticks. J. Med. Entomol. 38, 1-11.
- Samish, M., Glazer, I., 2001. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. Trends in Parasitol. 17, 368-371.

- Samish, M., Ginsberg, H., Glazer, I., 2004. Biological Control of Ticks. Parasitol. Cambridge University Press. S389-S403.
- Samish, M., Rehacek, J., 1999. Pathogens and Predators of Ticks and their potential in Biological Control. Annual Review of Entomol. 44, 159-182.
- Sazima, I., Sazima, C., 2010. Cleaner birds: an overview for the Neotropics. Biota Neotrop. 10, 195-203.
- Sauer, J. R., Hair, J. A., .1986. Morphology, Physiology, and Behavioral Biology of Ticks. 1986, en Rechav., M. E. Zeederberg, Horwood, E., Tick population if two breeds of cattle under field conditions, with a note on blood components related to host resistance. 510 pp.
- Schaaf, O., Jarvis, A.P., SVan der Esch, A. S., Giagnacovo, G., Oldham, N.J., 2000. Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. J. of Chromatography A. 886. 89-97.
- Schulze, T. J., Jordan, R. A., Hung, R. W., 2001. Effects of selected meterological factors on diurnal questing of *Ixodes scapularis* and *Amblyomma Americanum* (Acari: Ixodidade). J. Med. Entomol. 38, 318-324.
- Schmutterer, H., 1990. Properties and Potential of Natural Pesticides from the Neem Tree, *Azadirachta Indica*. Annual Rev. of Entomol. 35, 271-297.
- Sidorov, V. E., Scherbakov, S. V., 1973. Mass epizootics among *Alveonasus lahorensis* Neumman ticks. Med. Parazitol. Parazit. Bolezn. 42, 47-51.
- Siroky, P., Erhart, J., Petrzekova, K.J., Kamler, M., 2011. Life cycle of tortoise tick *Hyalomma aegyptium* under laboratory conditions. Exp. Appl. Acarol. 54, 277-284.

- Snyder, E. D., Cruthers. L R., Slone, R.L. 2009. Preliminary study on the acaricidal efficacy of spinosad administered orally to dogs infested with the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Vet. Parasitol. 166, 131-135.
- Soberon, M., Bravo, A., 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. Biotecnología. 14, 303-314.
- Sobrino, R., Millán, J., Oleaga, A., Gortázar, C., de la Fuente, J., Ruiz-Fons, F., 2012. Ecological preferences of exophilic and endophilic ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing wild carnivores in the Iberian Peninsula. Vet. Parasitol. 184, 248 257.
- Sonenshine, D. E., 1991. Biology of ticks I. New York (USA) OxfordUniversity Press Inc .540 pp.
- Sonenshine, D. E. 1993. Biology of ticks, Vols I y II. Oxford University Press, UK.
- Sonenshine, D. E., Lane, R. S., Nicholson, W. L. 2002. Ticks (Ixodida), en Mullen, G. R., Durden, L. A., Medical and Veterinary Entomology. San Diego, California. USA. Academic Press. 518 pp.
- Sonenshine, D. E., 2008. Pheromones and other semiochemical of ticks and their use in tick control, en Bowman, A.S., Nutall, P., Ticks Biology, Disease and Control Cambridge University Press. 506 pp.
- Stafford, K. C., III. 2004. Tick Management book. The Connecticut Agricultural Experiment Station. USA. pp 71.
- Stutterheim, I. M., Bezuidenhout, J.D., Elliott, G.E. 1988. Comparative feeding behavior on food preferences of oxpeckers (*Buphagus erythrorhynchus* and *B. africanus*) in captivity. Onderstepoort J. Vet. Res. 55, 173-179.

- Tagliapietra, V., Rosà, R., Arnoldi, D., Cagnacci, F., Capelli, G., Montarsi, F., Hauffe, F.C., Rizzoli, A., 2011. Saturation deficit and deer density affect questing activity and local abundance of *Ixodes ricinus* (Acari, ixodidae) in Italy. *Vet. Parasitol.* 183, 114-124.
- Takasu, K., Nakamura, S., 2008. Life history of the tick parasitoid *Ixodhipagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae) in Kenya. *Biological Control* 46, 114-121.
- Tanada, Y., 1964. A granolosis virus of the codling moth, *Carpocasa pomonellas* Linnaeus (Olethreutidae, Lepidoptera). *J. of Insect Pathol.* 6, 378-380.
- The Manual of Biocontrol Agents. 2009. Keystone Publications of British Crop Production Council. Edited by Leonard G. Copping.
- Toledo, A., Jado, I., Olmeda, A.S., Casado-Nistal, M.A., Gil, H., Escudero, R., Anda, P., 2009a. Detection of *Coxiella burnetii* in Ticks Collected from Central Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 9, 465-468.
- Toledo, A., Olmeda, A. S., Escudero, R., Jado, I., Valcárcel, F., Casado-Nistal, M. A., Rodríguez-Vargas, M., Gil, H., Anda, P., 2009b. Tick–Borne Zoonotic Bacteria in Ticks Collected from Central Spain. *American J. of Tropical Medicine and Hygiene*, 1, 67-74.
- TOXNET 2007. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=DBMaint&actionHandle=default&nextPage=jsp/chemidlite/ResultScreen.jsp&TXTSUPERLISTID=0000144627>. Consultada en Julio y Septiembre de 2011.
- Travassos Santos Dias, J. A., 1994. As carraças (Acarina-Ixodoidea) da Península Ibérica, algumas considerações sobre a sua biogeografia e relacionamento com a ixodofauna afropaleárctica e afrotropical. Ministério do Planeamento e da Administração do Território, Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia, Instituto de Investigação Científica Tropical. Lisboa, Portugal. 163 pp.

- Valcárcel, F., Pérez Sánchez, J. L., Tercero-Jaime, J. M., Basco-Basco, P. I., Cota-Guajardo, S., Cutuli, M. T., Martín-Hernández, R., Olmeda, A. S., 2014. Control of Host-seeking Adults of *Hyalomma lusitanicum* with Oxalic Acid. International. J. Vet. Medicine: Res. & Rep. Article ID 871622. 1-9.
- Valcárcel, F., Pérez Sánchez, J. L., Tercero-Jaime, J. M., Basco-Basco, P. I., Cota-Guajardo, S., Cutuli, M. T., González, J., Olmeda, A.S. Control of Tick Infestations in *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha: Leporidae) with Spinosad under Field Conditions. J. Med. Entomology. Aceptado 2014.
- Viseras, J., Hueli, L., Adroher, F. J., García-Fernández P., 1999. Studies on the transmission of *Theileria annulata* to cattle by the tick *Hyalomma lusitanicum*. J. Vet. Medicine. 46, 505-509.
- Willadsen, P., McKenna, R. V., 1991. Vaccination with 'concealed' antigens: myth or reality? Parasite Immunology. 13, 605-616.
- Willadsen P. 1999. Immunological control of ectoparasites: past achievements and future research priorities. Genetic Analysis: Biomolecular Engineering. 15 (1999) 131-137.
- Willadsen, P., 1997. Novel vaccines for ectoparasites. Vet. Parasitol. 71, 209-222.
- Willadsen, P., 2004. Anti-ticks vaccines. 2004. Parasitol. 129, 367-387.
- Willadsen, P., 2006. Tick control: Thoughts on a research agenda. Vet. Parasitol. 138, 161-168.
- Walker, R. A., 2009. Riview of: "Ticks, Biology, Disease and Control" by Alan Bowman and Patricia Nutell. *Parasites & Vectors* 2009, 2, 1.
- Weeks, P., 2000. Red. billed oxpeckers: vimpres or tick birds?. Behavioral ecology. 11, 154-160.

- Witting-Bissinger, B. E., Stumpf, C. F., Donohue, K. V., Apperson, C. S., Roe, R.M., 2008. Novel Arthropod Repellent, BioUB, Is an Efficacious Alternative to Deet. J. Med. Entomol. 45, 891-898.
- Zabalgogezcoa, I. A.O., Pérez-Sánchez, R., 2008. Pathogenicity of endophytic entomopathogenic fungi to *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). Vet. Parasitol. 158, 336-346.